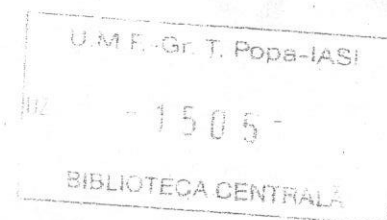


TRATAT DE BIOMOLECULE

EDIȚIA A-II-A



Editura „Gr. T. Popa”, U.M.F. Iași
2016

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

Tratat de biomolecule. - Ed. a 2-a. - Iași : Editura Gr.T. Popa,
2016-4 vol.

ISBN 978-606-544-390-7

Vol. 2 / Mihai Chiriță, Gheorghe Chiriță. - 2016. - Conține
bibliografie. - ISBN 978-606-544-427-0

I. Chiriță, Gheorghe

577.2(035)

Mihai Chiriță

Gheorghe Chiriță

Referenți științifici:

Prof. univ. dr. Ion Poeată

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași
Facultatea de Medicină

Prof. univ. dr. ing. Anca Galaction

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași,
Facultatea de Bioinginerie Medicală

Coperta: Marius Atanasiu

Tehnoredactare computerizată și corectură: Mihai Chiriță

Editura „Gr. T. Popa”

Universitatea de Medicină și Farmacie

Iași

Str. Universității nr. 16

*Editura „Gr. T. Popa” este acreditată de CNCIS - Consiliul Național al
Cercetării Științifice din Învățământul Superior*

*Toate drepturile asupra acestei lucrări aparțin autorului. Nici o parte din
acest volum nu poate fi copiată sau transmisă prin nici un mijloc, electronic
sau mecanic, inclusiv fotocopiare, fără permisiunea scrisă din partea
autorului.*

Tiparul executat la Tipografia Universității de Medicină și Farmacie "Gr. T. Popa" Iași
str. Universității nr. 16, cod. 700115, Tel. 0232 301678

TRATAT DE BIOMOLECULE

EDIȚIA A-II-A

VOLUMUL 2

Prof.univ.dr.doc.ing.Gheorghe Chiriță s-a născut la Bacău în 22.09.1926.

A absolvit în anul 1951 cursurile Facultății de Chimie Industrială a Universității Tehnice din Iași, unde și-a desfășurat ulterior întreaga carieră.

A fost numit asistent universitar în anul 1951, a devenit doctor inginer în anul 1957, profesor universitar în anul 1965, doctor docent și conducător științific de doctorat în anul 1971. Sub îndrumarea sa, au obținut titlul de doctor 10 doctoranzi în domeniul chimiei colagenului și tehnologiei pieilor și blănurilor.

A îndeplinit mulți ani funcția de șef de catedră și a ocupat funcții administrative de prodecan, apoi de prorector, în două legislaturi consecutive (1976-1984). A elaborat și tipărit 9 cărți la editurile: Ed. Didactică și Pedagogică și Edi Tehnică București, Ed.Gh.Asachi Iași, în domeniile: tehnologia pieilor, pielea animală și chimia colagenului. A obținut 20 de brevete de invenție și a publicat, în reviste din țară și din străinătate, peste 160 de lucrări științifice.

În anul 1970 a fost profesor invitat în S.U.A. unde a conferențiat în domeniul chimiei colagenului în 7 capitale statale.

În anul 1991, a înființat Societatea Română a Chimiștilor din Industria de Pielărie, pe care a asociat-o la Uniunea Internațională a Societăților Chimiștilor din Industria de Pielărie, a cărui președinte onorific a fost.

S-a stins din viață în data de 19.09.2011 la vârsta de 85 de ani.

Prof.univ.dr.ing.Mihai Chiriță s-a născut la Iași în 26.03.1955

A absolvit cursurile Facultății de Chimie Industrială a Universității Tehnice din Iași, în anul 1980, obținând titlul de doctor inginer în anul 1993.

A urcat toate treptele ierarhiei universitare, în anul 2003 devenind primul profesor universitar din România în specialitatea de biomateriale, la Facultatea de Bioinginerie Medicală, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr.T.Popa” din Iași. Este titular al cursurilor de: Biomateriale organice naturale, Fenomene de transfer în bioinginerie, Bioateriale speciale și tehnologii biomimetice, Biomateriale și sisteme de eliberare controlată a principiilor bioactive, Substituenți sanguini etc.

În paralel, în baza brevetelor proprii de invenție, a avut o bogată activitate în unități de producție și de cercetare, ocupând succesiv toate pozițiile necesare pentru ca o idee să devină un produs finit: brevetare, testare, marketing, reprezentant tehnic, director de vânzări, director de cercetare & dezvoltare, director tehnic în societăți cu profil chimic, expert tehnic, consilier și reprezentant al unor firme străine în România. Din anul 2003, s-a implicat constant în înțelegerea și aplicarea biomimeticii în bioingineria medicală. A fost numit membru fondator și reprezentantul României în International Society of Bionic Engineering și membru al comitetului editorial al revistei Journal of Bionics Engineering. A elaborat și tipărit, ca autor, coautor sau editor, 15 cărți și 2 capitole de carte în domeniul său de specialitate, peste 100 de lucrări științifice, 29 de brevete și cereri de brevet de invenție dintre care 12 au fost aplicate în practică și în 5 mărci de produs.
www.biomateriale.ro

CUPRINS

Volumul 2

PARTEA a III-a

3. APA	449
3.1. Considerații generale	450
3.2. Proprietățile fizice ale apei	453
3.3. Structura apei și a gheții	459
3.4. Apa grea	465
3.5. Soluțiile în apă	467
3.5.1. Aciditatea și alcalinitatea soluțiilor	469
3.6. Apa ca solvent	475
3.7. Apa biologică	478
Bibliografie	482

PARTEA a IV-a

4. ZAHARURI 483

4.1.	Introducere	484
4.2.	Monozaharide	484
4.2.1.	Proprietăți fizice și chimice ale monozaharidelor	490
4.2.2.	Monozaharide mai importante	492
4.3.	Oligozaharide	494
4.4.	Polizaharide	497
4.4.1.	Polizaharide de rezervă	498
4.4.2.	Polizaharide de structură	502
4.5.	Glicoproteide	506
4.5.1.	Mucopolizaharide	509
4.5.1.1.	Acidul hialuronic	510
4.5.1.2.	Condroitina, Condroitin 4 sulfatul, Condroitin 6 sulfatul	511
4.5.1.3.	Sulfatul de dermatan	512
4.5.1.4.	Heparina, Sulfatul de heparină	513
4.5.1.5.	Sulfatul de keratan	514
4.5.1.6.	Hidratarea mucopolizaharidelor	514
	<i>Bibliografie</i>	517

5. LIPIDE 519

5.1.	Introducere	520
5.2.	Lipidele complexe	520
5.2.1.	Gliceridele	520
5.2.1.1.	Proprietățile fizice și chimice ale gliceridelor	522
5.2.2.	Acizii grași	525
5.2.3.	Alchileteracilglicerolii	528
5.2.4.	Glicozilacilglicerolii	528

5.2.5.	Fosfogliceridele	529
5.2.6.	Sfingolipidele	531
5.2.6.1.	Sfingomielinele	533
5.2.6.2.	Glicosfingolipidele neutre	533
5.2.6.3.	Glicosfingolipidele acide	534
5.2.7.	Cerurile	535
5.3.	Lipidele simple	536
5.3.1.	Terpenele	536
5.3.2.	Steroidele	538
5.3.3.	Prostaglandinele	543

<i>Bibliografie</i>	544
---------------------	-----

6. ACIZI NUCLEICI 547

6.1.	Noțiuni generale	548
6.2.	Pirimidine și purine	549
6.2.1.	Pirimidina	549
6.2.2.	Purina	551
6.3.	Nucleozide	553
6.4.	Nucleotide	555
6.5.	Acidul dezoxiribonucleic (ADN)	557
6.5.1.	ADN viral	565
6.5.2.	ADN bacterian	566
6.5.3.	Cromozomii eucariotelor	566
6.5.4.	Rolul genetic al ADN	569
6.5.5.	Proprietățile ADN în soluție	572
6.6.	Acidul ribonucleic (ARN)	574
6.6.1.	Acidul ribonucleic mesager (ARNm)	575
6.6.2.	Acidul ribonucleic de transfer (ARNt)	576
6.6.3.	Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr)	580
6.6.4.	Ribozomii	580
6.6.5.	Virusurile	581
6.7.	Acțiunea și interacțiunea genelor	583
6.7.1.	Reglarea activității genelor	589
6.8.	Măsurarea concentrației și purității acizilor nucleici	594
6.8.1.	Metode optice	594
6.8.2.	Metoda fluorescenței	594

6.9.	Păstrarea ADN	595
6.10.	Purificarea ADN	595
6.11.	Precipitarea ADN	595
6.12.	Izolarea ADN din din Escherichia coli	596
6.13.	Izolarea plasmid ADN	597

<i>Bibliografie</i>	599
---------------------	-----

7. AMINOACIZI 601

7.1.	Considerații generale	602
7.2.	Proprietățile fizice ale aminoacizilor	614
7.3.	Proprietățile chimice ale aminoacizilor	625
7.4.	Stereochimia aminoacizilor	631
7.4.1.	Configurația aminoacizilor	633
7.5.	Biochimia aminoacizilor	641
7.5.1.	Aminoacizii în alimentație	641
7.5.2.	Degradarea oxidativă a aminoacizilor	643
7.5.3.	Decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme	653
7.5.4.	Transaminarea	656
7.6.	Aminoacizi mai importanți și derivații lor	658
7.7.	Sinteze de aminoacizi	664

<i>Bibliografie</i>	671
---------------------	-----

8. PEPTIDE 673

8.1.	Caracteristici generale	674
8.2.	Sinteza peptidelor	678
8.2.1.	Sinteza peptidelor pe suport polimer	686
8.3.	Peptide naturale biologic active	689

<i>Bibliografie</i>	691
---------------------	-----

9. BIOSINTEZA PROTEINELOR 693

9.1.	Traducerea mesajului genetic la biosinteza proteinelor	694
9.2.	Inhibitori ai biosintezei proteice	699
9.3.	Poliribozomii	701
9.4.	Mitocondriile	703
9.5.	Codificarea informației genetice	704
9.5.1.	Originea și evoluția codului genetic	708
9.5.2.	Purificarea proteinelor	712

<i>Bibliografie</i>	716
---------------------	-----

10. PROTEINE 719

10.1.	Considerații generale	720
10.2.	Fundamentul structurii proteinelor	734
10.3.	Structura proteinelor	740
10.3.1.	Determinarea succesiunii aminoacizilor	742
10.4.	Funcțiile biologice ale proteinelor	750
10.5.	Denaturarea proteinelor	751
10.6.	Stabilitatea și funcțiile proteinelor	752
10.7.	Proteine mai importante	755
10.7.1.	Proteine solubile	757
10.7.1.1.	Proteine de transport	768
10.7.1.2.	Proteine de transport a moleculelor și a ionilor prin membranele celulare	795
10.7.2.	Proteine insolubile	803
10.7.3.	Proteide	804
10.8.	Separarea, purificarea și caracterizarea proteinelor	807
10.8.1.	Considerații generale	807
10.8.2.	Separarea proteinelor din amestecuri	811
10.8.3.	Extracția și purificarea proteinelor	815
10.8.4.	Caracterizarea moleculelor de proteine	815

<i>Bibliografie</i>	815
---------------------	-----

11. ENZIME	821
11.1. Caracteristici generale	822
11.2. Activitatea catalitică a enzimelor	825
11.3. Cinetica reacțiilor catalizate enzimatic	830
11.3.1. Efectul concentrației de substrat asupra activității enzimatic	832
11.3.2. Efectul temperaturii asupra activității enzimatic	834
11.3.3. Efectul pH-ului asupra activității enzimatic	835
11.3.4. Influența activatorilor și a inhibitorilor asupra activității enzimatic	836
11.4. Specificitatea catalizei enzimatic	839
11.5. Enzime proteolitice	842
11.5.1. Enzime proteolitice ale vertebratelor	842
11.5.2. Enzime proteolitice ale sângelui	849
11.5.3. Enzime proteolitice de origine vegetală	851
11.5.4. Enzime proteolitice microbiene și fungice	852
<i>Bibliografie</i>	854

PARTEA a III-a

CAPITOLUL 3

3. APA	
3.1. Considerații generale	450
3.2. Proprietățile fizice ale apei	453
3.3. Structura apei și a gheții	459
3.4. Apa grea	465
3.5. Soluțiile în apă	467
3.5.1. Aciditatea și alcalinitatea soluțiilor	469
3.6. Apa ca solvent	475
3.7. Apa biologică	478
<i>Bibliografie</i>	482

3.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Apa a apărut pe pământ cu circa 4 miliarde de ani în urmă și este evaluată cantitativ la circa 1400 milioane de km³.

Proveniența apei de pe Pământ a fost atribuită unei surse duale: endogenă și exogenă.

Teoria endogenă arată că întreaga cantitate de apă s-a format în interiorul tinerei planete Pământ, din hidrogen și oxigen, și, sub formă de vaporii, aceasta a ieșit la suprafață. Temperaturile fiind foarte ridicate, apa s-ar fi menținut doar sub formă de vaporii, migrând în spațiu.

"Când s-a format Pământul, era atât de fierbinte, încât cele mai multe materiale volatile au ajuns în spațiu, așa că atunci când Pământul s-a racorit, era uscat ... Apa și alte materiale volatile au fost aduse aici într-o etapă mai târzie", a declarat Paul Hartogh, cercetător la Institutul Max Planck din Germania.

În sprijinul acestei teorii John Valley a arătat că analizele efectuate asupra unor cristale preistorice au condus la concluzia că apa, în stare lichidă, există pe Pământ de cel puțin 4,3 miliarde de ani.

Teoria exogenă susține că apa ar fi ajuns pe Pământ din spațiul cosmic. Cercetătorii afirmă că bulgării giganti de gheață, cometele, dar și asteroizii, care au lovit planeta Pământ în urmă cu 3,85 miliarde de ani, constituie sursa cea mai probabilă a oceanelor de pe Terra.

Apa, precum cea din oceanele terestre a fost descoperită în cometa Hartley 2, observată de sonda Deep Impact/EPOXI, în noiembrie 2010. "Descoperirea noastră sugerează că cometele au adus mai mult de 10% din apa de pe Pământ, fiind posibil ca toată să provină din acestea", a declarat Paul Hartogh.

Apa descoperită în mantaua Lunii are aceeași origine ca apa de pe Terra, provenind din meteoriți primitivi.

"Amprenta de proveniență" a apei din galaxie este dată de proporția dintre hidrogen și deuteriu.

Apa se află la originea vieții pe Terra și este indispensabilă supraviețuirii a tot ce este viu.

Viața există oriunde se afla apă.

Apa acoperește trei sferturi din suprafața planetei și se găsește sub formă lichidă în ploaie, în cursurile de apă, lacuri, în pânzele de apă subterană, în mări și oceane, în sol, în floră și în faună, sub formă de vaporii în atmosferă, și în forme solide, ca zăpadă și gheață.

Apa se transformă neîncetat în vaporii, apoi în apă lichidă și gheață, ciclul care se repetă continuu.

În natură, prin acțiunea conjugată a căldurii solare și a presiunii atmosferice, apa, de la suprafața apei lichide, din solurile umede, din frunzele plantelor, își schimbă starea, se evaporă, trecând în atmosferă, sub formă de vaporii invizibili, unde rămâne până la circa opt zile. Acești vaporii formează norii, din care, apa sub formă de ploaie, zăpadă sau grindină (520km³ de precipitații anual) cade pe continente, mări și oceane și realimentează rezervele de apă dulce ale planetei.

În raport cu masa totală a hidrosferei, vaporii de apă reprezintă doar 0,001% din totalul apei de pe planetă.

Apa dulce de pe planetă reprezintă doar 2,8% din apa totală de pe glob. Din acest procent, 2,15% este apa din ghețarii polari, 0,63% apa subterană și 0,019% este apa de suprafață (lacuri, fluvii, râuri). Restul de apă, 97,2%, este apa sărată a mărilor și oceanelor, care acoperă 71% din suprafața planetei.

Pe plan mondial, problema aprovizionării cu apă dulce devine, în fiecare zi, tot mai preocupantă. Situația este precară mai ales în unele regiuni ale globului și se accentuează pe măsura creșterii populației.

Toate organismele animale și vegetale conțin apă, care după proporția sa este pe de parte componentul principal al materiei vii.

Vegetalele conțin o cantitate mai mare de apă (pepenele conține 95% apă, morcovul 85%, iarba 78% etc.). În organismele animale, apa se găsește, în medie, în proporție de peste 60%.

Organismele unor animale marine conțin până la 96-97% apă (de exemplu, meduzele). Conținutul mediu de apă al vertebratelor este mai redus din

cauza scheletului care ocupă un procent important din organism și este sărac în apă.

Organismul omului adult conține 58–66% apă, în funcție de adipozitate. Conținutul de apă este influențat și de vârstă. Astfel, embrionul de câteva zile are 97% apă, fătul de trei luni 94%, noul născut 66%. Conținutul în apă a unor organe, țesuturi și lichide din organismul uman este foarte variat.

Astfel, lichidele biologice (saliva (99,5%), sudoarea (99,5%), lichidul cefalorahidian (90%), suc gastric (97%), limfa (96%), laptele (89%), sângele (78–83%), creierul (80%)) conțin 78–99,5% apă. La om, țesuturile conțin 70–83% apă, scheletul osos 20–30% apă, mușchii conțin 73–76% apă, etc.

Cele aproximativ 60% apă din organismul uman se repartizează între vasele sanguine și cele limfatice, spațiile intercelulare și în celule, domenii cu compoziții și roluri funcționale diferite. Lichidul intracelular reprezintă 50% din greutatea corpului și lichidul extracelular (plasma sanguină și lichidul interstițial) 20% din greutatea corpului (Fig. 3.1.) [8].

Proporția de apă din organism variază cu vârsta: 97% la embrionul de 7 zile, 80% la nou-născut, 60–65 % la adult și 50–55 % la vârstnici.

Deși nu are rol energetic, apa constituie cel mai important aliment datorită implicării sale în toate procesele vitale.

“Apă tu ești nu numai necesară vieții, ci ești însuși viața; ești bogăția fără seamăn pe Pământ, tu ești cea mai delicată, cea mai pură, tu ești sufletul Pământului”, Antoine de Saint – Exupery.

Fără a greși, se poate afirma că *apa este solventul vieții*.

Apa îndeplinește în organism rolul de solvent al unui număr mare de compuși organici și anorganici. Pe această bază are rolul de a transporta în organism substanțele nutritive și mediatorii controlului umoral, cât și produsele de excreție rezultate în urma diverselor procese metabolice [8].

Apa este alimentul indispensabil care asigură, în organism, desfășurarea normală a metabolismului tuturor celorlalte principii nutritive. S-a dovedit că apa înseamnă cu adevărat viață.

Fără alimente omul poate rezista 30–40 de zile, dar fără apă, nu supraviețuiește mai mult de 3–4 zile.

Lipsa unui aport normal zilnic de apă conduce la acidifierea mediului intern (sânge, limfă), pregătindu-se astfel terenul propice pentru bolile civilizației moderne.

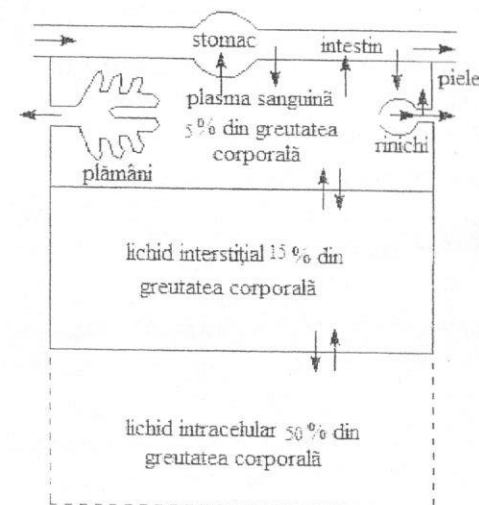


Fig.3.1. Repartiția apei în organism (după Gamble).

În organism, apa are *rol structural*, intrând în constituția diverselor geluri, fiind reținută prin capilaritate; de asemenea, se găsește în spațiile libere dintre moleculele mari sau reținută fizic la suprafața moleculelor proteice. Are rol plastic, fiind unul dintre componentele principale ale întregului organism, participă direct în procesul de creștere a organismului și la formarea celulelor.

Apa conținută în corpul uman servește ca suport al unui număr mare de reacții și schimburi biochimice fundamentale care sunt necesare vieții:

a. participă la reacții hidrolitice, ca de exemplu, la digestia alimentelor, la dislocarea majorității constituienților organismului, la hidroliza ATP-ului și a altor compuși macroergici în urma cărora se eliberează energie;

b. participă la reacții de oxido-reducere, care, de cele mai multe ori, sunt reacții de hidratare urmate de reacții de dehidrogenare.

Apa intervine în reglarea termică constantă a corpului.

Cantitatea de apă din organism este invers proporțională cu vârsta. Astfel, la embrion apa reprezintă peste 90%, la copilul mic în jur de 80%, la copilul de vârstă școlară 70%, iar la adult apa reprezintă doar 60-65% din greutatea corporală.

3.2. PROPRIETĂȚILE FIZICE ALE APEI

În anul 1781, Henry Cavendish a constatat că apa se formează la arderea hidrogenului în aer. Antoine Laurent Lavoisier repetând experiența lui Cavendish a reușit sinteza apei, arătând că 2 g de hidrogen și 16 g de oxigen duc la formarea a 18 g de apă.

În 1805 Alexander von Humboldt și L.J. Gay-Lussac au arătat că apa este formată din două volume de hidrogen și un volum de oxigen.

În ciuda proprietăților sale complexe, apa are o compoziție extrem de simplă.

Proprietățile fizice și chimice ale apei, diferite de cele ale altor substanțe cu masă moleculară similară, au la origine legătura de hidrogen [6].

Apa are o puternică înclinare de a dizolva alte substanțe.

Apa dizolvă dioxidul de carbon din aer, care se transformă în acid slab capabil să dizolve calcarul. La creșterea temperaturii sau la o aerare a apei, calcarul se reprecipită sub formă de tartru (tartrat acid de potasiu). În acest fel apa oceanelor reglează conținutul de dioxid de carbon din atmosferă.

Apa lichidă nu se comprimă și nici nu-și crește volumul (principiul lui Pascal).

Apa are punctul de topire, punctul de fierbere, căldura de topire, căldura de evaporare, căldura specifică, constanta dielectrică și tensiunea superficială mai mari decât ale unor hidruri comparabile, vecine din sistemul periodic al elementelor, ca H_2S , NH_3 , CH_4 , H_2Se și decât ale celor mai multe dintre lichidele obișnuite.

Toate aceste proprietăți indică faptul că forțele de atracție dintre moleculele apei lichide, respectiv coeziunea sa internă, sunt relativ mari.

Se dau mai jos câteva dintre caracteristicile fizice ale apei :

- presiunea de vapori a apei la $20^\circ C$ sau $293^\circ K = 17,5$ torr și la $100^\circ C$ sau $373^\circ K = 760$ torr sau 1,0 atm;
- căldura latentă de vaporizare a apei la punctul de fierbere, la presiunea de 1 atm este de 540 cal/g sau 9729 cal/mol
- punctul de topire = $273^\circ K$;
- căldura latentă de topire = 80 cal/g;
- căldura latentă molară de topire = 1440 cal/mol;
- căldurile molare, la presiune constantă (C_p), a vaporilor de apă la presiunea de 1 atm sunt:

$0^\circ C$	7,98 cal/grad.mol
$1000^\circ C$	10,58 cal/grad.mol
$2000^\circ C$	12,45 cal/grad.mol

- tensiunea superficială a apei la $20^\circ C = 72,7$ dyne/cm;
- rezistivitatea sau rezistența specifică (ρ) în $ohmi^{-1} \cdot cm = 2,5 \cdot 10^7$;
- conductibilitatea specifică ($1/\rho$) în $ohmi \cdot cm^{-1} = 4 \cdot 10^{-8}$;
- momentul electric al apei în formă gazoasă, în unități debye $D = 1,84$;
- constante critice ale apei :
 - temperatura critică, $647^\circ K$ sau $374^\circ C$
 - presiunea critică 218,5 atm
 - volumul molar critic, $57 cm^3$

La înghețarea apei are loc o scădere bruscă a densității, respectiv o creștere a volumului cu aproape 10%.

Densitatea gheții la $0^\circ C$ este de $0,91 g/cm^3$.

Punctul de solidificare a apei ($0^\circ C$ și 760 torr) scade când se mărește presiunea.

Mărirea presiunii deplasează echilibrul gheață-apă lichidă înspre forma cu volumul mai mic și densitatea mai mare, deci, spre apă lichidă.

Anomaliile densității apei au o mare influență asupra climei planetei și asupra vieții animalelor și plantelor.

Apa, la 4°C, are densitatea mai mare decât apa mai caldă sau mai rece și, de aceea, se adună la fundul mărilor și oceanelor. Aceasta are, până la adâncimea de 1000 m, temperatura de 4°C, iar între 1000-3000 m, circa 3°C. Datorită acestui fenomen, apele mai adânci nu îngheață în totalitate și fac astfel posibilă viața acvatică.

Apa este un lichid transparent, aproape fără culoare, cu o ușoară nuanță de albastru.

În condiții normale de presiune și temperatură viteza sunetului în apă este de 1500 m/s.

Există o situație unică (T, P) în care apa coexistă sub trei forme: solidă, lichidă și gazoasă, acesta este *punctul triplu al apei* și are loc la o temperatură de 0,01°C (273,16°K) și o presiune de 611,2 Pa.

Unitățile de temperatură (grade Celsius sau Kelvin) sunt definite grație acestui punct triplu al apei.

Masa unui litru de apă la temperatura de 4°C este de 1 Kg, densitatea la această temperatură fiind egală cu unitatea.

Căldura masică a apei este de 4186 J/Kg·°K în condiții normale de temperatură și presiune. Apa a fost utilizată ca etalon de căldură în vechile sisteme de unități, caloria fiind căldura necesară creșterii cu un grad Celsius a temperaturii unui gram de apă, adică de 4186 Jouli.

Când este în contact cu aerul atmosferic, apa absoarbe mai mult oxigen și mai puțin azot, comparativ cu raportul în care aceste gaze se găsesc în aer. De exemplu, la 0°C aerul conține circa 21% O și 79% N, în timp ce apa conține 34% O și 66% N.

După Biman Bagchi [11], se pot evidenția la apă șase însușiri unice, responsabile pentru comportarea sa în diverse anturaje chimice:

- molecula apei are dimensiuni și masă moleculară mici;
- din cauza mării diferențe dintre electronegativitatea atomilor componenți, sarcinile se distribuie de-a lungul legăturilor, facilitând formarea legăturilor de hidrogen;

- legăturile de hidrogen dintre moleculele de apă se realizează de la o moleculă donatoare la una acceptoare, printr-un dublet de electroni ai atomului de oxigen, ceea ce conferă legăturii un oarecare caracter covalent (5%);
- datorită dipol momentului electric, molecula de apă lichidă are o constantă dielectrică cu valoare mare (80,08, la temperatura camerei); dubletele de electroni ale oxigenului fac molecula de apă polarizabilă în câmp electric, în raport cu alte molecule din anturajul chimic și la interfața cu suprafețele încărcate electric;
- o sumă de molecule de apă poate forma mai multe structuri, clusteri [12], cu energii apropiate;
- abilitatea extraordinară a apei de a forma și reface rețele de legături de hidrogen, fără de care multe procese dinamice nu s-ar putea desfășura (vezi solicitarea la tracțiune la biocompozite – volumul I).

Apa are o forță de coeziune ridicată, care o face să se evapore cu dificultate.

Întrucât oxigenul apei are o electronegativitate mai mare decât a hidrogenului, partea moleculei de apă unde se găsește atomul de oxigen este mai încărcată negativ în comparație cu partea ocupată de atomii de hidrogen.

O moleculă cu o astfel de diferență de încărcare se numește dipol.

Apa are un moment de dipol de 1,83D, ca rezultat al compunerii geometrice a momentelor de dipol (1,54D) ale celor două legături O-H, care formează între ele un unghi de 104,5°.

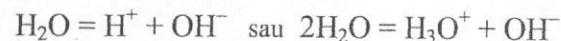
Această diferență de încărcare electrică face ca moleculele de apă să se atragă între ele formând legături de hidrogen.

Polarizarea permite moleculelor de apă să dizolve substanțele ionice și să le mențină în această stare prin înconjurarea fiecărui ion cu un înveliș de molecule de apă; aceasta este *solvatarea*.

Forțele de atracție sunt cauza unui punct de fierbere ridicat și a unei capacități calorice ridicate.

Apa pură nu se găsește în natură dar poate fi obținută prin procese fizice.

Singurii săi compuşii sunt moleculele de apă și ionii produși prin hidroliza moleculelor de apă:



Apa, la presiunea ambiantă de 1 atm și temperatura de 0–100°C este lichidă, peste 100°C este gazoasă și sub 0°C este solidă.

Particulele suspendate în lichide, dar și moleculele lichidelor se deplasează în spațiu prin mișcare Browniană.

Poate fi definit ca *drum liber mediu*, distanța parcursă de o moleculă între două ciocniri succesive (X, Fig.3.2.), în funcție de mărimea și forma moleculelor, de temperatură și de vâscozitatea fluidului.

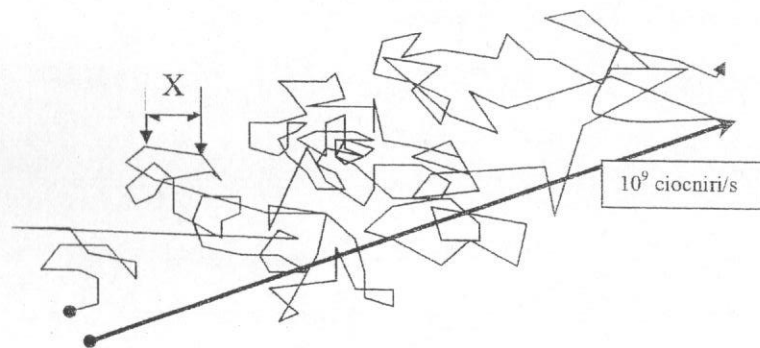


Fig.3.2. Difuzia moleculară

Conform teoriei cinetice a gazelor, deplasarea moleculelor are loc prin ciocniri succesive aleatoare între molecule, ciocniri soldate cu modificări de viteză, atât ca direcție, cât și ca mărime.

Einstein a demonstrat că mișcarea Browniană este consecința mișcării naturale a moleculelor, proces controlat de temperatura sistemului (termodifuziunea).

Difuzia moleculară este un mecanism care are loc la nivel molecular și

constă în transportul unei specii moleculare, în interiorul unui amestec, atunci când în amestec există o diferență de potențial care crează un dezechilibru în interiorul acestuia [13].

Diferența de potențial poate fi determinată de existența unui:

- gradient de concentrație – difuzie Fick;
- gradient de temperatură – difuzie termică (termodifuziunea);
- gradient de presiune – difuzie de presiune.

Rezultanta este egalizarea diferențelor de concentrație, de presiune sau de temperatură, fenomenul fiind o expresie a tendinței naturale a sistemelor de a tinde spre starea de echilibru.

S-a constatat că, în cazul apei, moleculele nu execută doar o mișcare de mică amplitudine asemănătoare aceleia Browniene, dar și rotații și „salturi” pe distanțe mai mari.

Astfel, o moleculă de apă se deplasează în mediu lichid, pe o distanță de 2,75 nm (diametrul molecular al apei) în timp de 5 ps.

La temperatura de 25°C, rotația completă a unei molecule de apă se face într-un timp de 2,5 ps [11].

Aceste două valori caracteristice apei indică viteze de deplasare și de rotație surprinzător de mari, căci acestea trebuie să includă, atât ruperea, cât și refacerea legăturilor de hidrogen, cu moleculele de apă vecine.

Are loc un schimb permanent, între moleculele de apă, în ceea ce privește locul de legare a legăturilor de hidrogen între molecule vecine (mecanismul Laage–Hynes).

S-a determinat faptul că, în condiții normale de presiune și de temperatură, moleculele de apă se deplasează, în principal, pe distanțe mari [14].

3.3. STRUCTURA APEI ȘI A GHEȚII

Anomaliile proprietăților fizice ale apei se datoresc asocierii moleculelor de apă prin legături de hidrogen. Apa lichidă nu este formată din molecule independente, ci din molecule asociate. În stare de vapori, apa este compusă

din molecule „libere”.

Forțele intermoleculare puternice din apa lichidă se datoresc distribuției specifice a electronilor în molecula de apă.

Fiecare dintre cei doi atomi de hidrogen pune în comun, cu atomul de oxigen, o pereche de electroni, prin suprapunerea orbitalilor $1s$ ai atomilor de hidrogen, cu doi orbitali hibridi sp^3 ai atomului de oxigen.

Pe baza analizelor cu raze X, unghiul legăturii $H-O-H$ este de $104,5^\circ$, iar media distanței interatomice hidrogen–oxigen este de $0,0965\text{ nm}$.

Acest aranjament al electronilor din molecula de apă îi conferă acesteia asimetria electrică. Atomul de oxigen, puternic electronegativ, tinde să atragă electronii unici ai atomilor de hidrogen, lăsând nucleul de hidrogen dezgolit. Ca urmare, fiecare din cei doi atomi de hidrogen are o încărcare locală parțial pozitivă. În schimb, atomul de oxigen are o încărcare locală parțial negativă, localizată în zona orbitalilor nepuși în comun.

De aceea, deși molecula de apă nu are o încărcare netă, ea este un dipol electric [1].

Când două molecule de apă se apropie puternic una de alta, se produce o atracție electrostatică între încărcarea parțial negativă a atomului de oxigen al moleculei de apă și încărcarea parțial pozitivă a unui atom de hidrogen al moleculei de apă adiacente.

Aceasta este însoțită de o redistribuire a încărcărilor electronice în ambele molecule, ceea ce crește semnificativ atracția dintre ele.

O astfel de asociere electrostatică complexă poartă numele de *legătură de hidrogen*.

Legătura de hidrogen este, deci, de natură electrostatică, dar de un tip special, depinzând de prezența unui atom de hidrogen covalent și a doi atomi foarte electronegativi.

Apa este o substanță deosebit de capabilă de a forma legături de hidrogen. Fiecare moleculă de apă are doi atomi de hidrogen și două perechi de electroni neparticipanți și în consecință, poate forma patru legături de hidrogen.

Aranjamentul tetraedric al perechilor de electroni, participanți și neparticipanți, determină ca aceste patru legături să se extindă în patru direcții tetra-

edrice în spațiu, ajungându-se la structura cristalină caracteristică gheței (Fig.3.3).[4].

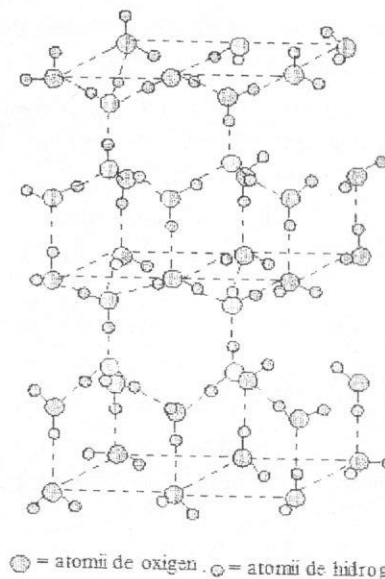


Fig.3.3. O porțiune dintr-un cristal de gheață

Gheața are un aranjament de bază, într-o rețea hexagonală, unde fiecare moleculă de apă are legături de hidrogen cu vecinele sale.

În gheața foarte puternic răcită, o moleculă de apă leagă alte patru molecule de apă prin legături de hidrogen; gheața are o structură mai afănată și o densitate mai mică decât cea a apei fluide.

La 0°C , 15% din legăturile de hidrogen se desfac, apa continuă să aibă o structură cristalină, dar din ce în ce mai mobilă.

Cu creșterea temperaturii, agregarea moleculelor de apă începe să se desfacă, se constată o creștere a densității lichidului, care atinge un maxim la 4°C . Peste această temperatură, din cauza agitației moleculare, valoarea densității descrește din nou:

0°	4°	10°	15°	20°
d = 0,999 866	1,000 000	0,999 727	0,999 127	0,998 230 g/cm ³

Către 40°C, 50% din legăturile de hidrogen se desfăc și apa devine mai fluidă și mai reactivă.

Apa lichidă conține numeroase legături de hidrogen și la 100°C, fapt dovedit de valorile sale mari ale căldurii de evaporare și a constantei dielectrice.

Legăturile de hidrogen au lungimi diferite în funcție de geometria structurală și de distribuția electronilor, în moleculele între care se stabilesc aceste legături.

În gheață, lungimea legăturii de hidrogen este de 0,177 nm (Fig.3.4.).

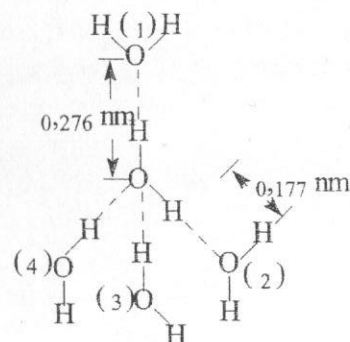


Fig.3.4. Legături de hidrogen dispuse tetraedric în jurul unei molecule de apă, în gheață.

Moleculele 1 și 2 și molecula din centru sunt dispuse în planul paginii.

Molecula 3 este dispusă deasupra paginii iar molecula 4 în spatele paginii.

În forma cristalină de gheață, când fiecare moleculă de apă leagă, prin legături de hidrogen, patru molecule de apă vecine, când se formează o rețea în care distanța medie oxigen-oxigen este de 0,276 nm.

La temperatura de 15°C, această distanță medie este de 0,290 nm și la 83°C de 0,305 nm [1].

Legăturile de hidrogen sunt mai puternice atunci când cele două grupări care interacționează sunt orientate în sensul realizării unei atracții electrostatice maxime.

De exemplu, când legătura H-O este liniară cu atomul acceptor, legătura de hidrogen formată va avea maximum de stabilitate (Fig.3.5.a). Când oxigenul acceptor nu este pe vectorul electric al legăturii O-H se formează o legătură de hidrogen mai slabă (Fig.3.5.b).

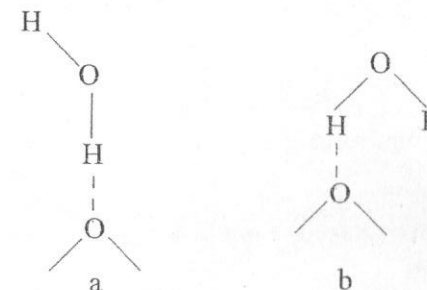


Fig.3.5. Orientarea legăturii de hidrogen

Legăturile de hidrogen sunt relativ slabe.

Legăturile de hidrogen din apa lichidă au o energie de legătură de 4,5 kcal/mol, față de 110 kcal/mol a legăturilor covalente H-O din molecula de apă.

În Fig.3.6. sunt prezentate câteva legături de hidrogen între apă și unele resturi de molecule organice cu importanță biologică.

Legăturile de hidrogen nu se formează numai în apă.

Ele au tendința de a se forma între un atom mic, puternic electronegativ (exemple, oxigen, azot, fluor, mai rar clor) și un atom de hidrogen legat covalent la un alt atom electronegativ [1, 2].

Legăturile de hidrogen se pot forma între două molecule sau între două părți ale aceleiași molecule.

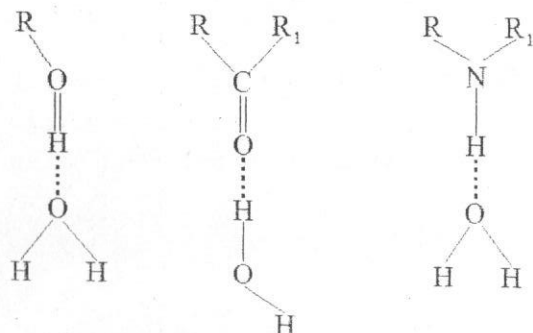


Fig.3.6. Legături de hidrogen între moleculele de apă și grupe reactive ale unor molecule organice

Apa lichidă este formată dintr-un amestec de molecule libere, molecule legate două câte două, grupe de patru și de opt molecule așezate ca în gheață, cu un spațiu între ele.

Proporția dintre cele patru forme diferă în funcție de temperatură.

Creșterea volumului apei prin înghețare, cu până la 10%, cu formarea de cristale, poate provoca dezorganizarea structurilor materiei vii.

Temperaturile foarte scăzute pot fi suportate, cu păstrarea organizării și a vieții latente, după o prealabilă desicăție.

Pentru ruperea legăturilor de hidrogen și a producerii agitației termice corespunzătoare creșterii temperaturii cu un grad, apa are nevoie de mai multă căldură decât alte lichide.

Căldura specifică sau capacitatea calorică mare a apei explică inerția termică a acesteia. Se încălzește și se răcește greu, adică are tendința de a-și păstra temperatura, fapt deosebit de important pentru toate viețuitoarele, îndeosebi pentru cele acvatice.

O consecință a legăturilor dintre moleculele de apă este căldura de evaporare mare a acesteia, de 0,538 cal/g, față de 0,202 cal/g pentru alcool, 0,09 cal/g pentru eter și de 0,068 cal/g pentru mercur.

Cantitatea mare de apă pe care o conțin viețuitoarele, se opune variațiilor de temperatură, contribuind astfel la termoreglarea animalelor homeoterme.

Capacitatea calorică mare a apei poate fi modificată de substanțele dizolvate în ea. Moleculele de apă din jurul ionilor se așează cu polul negativ (oxigenul) spre ionii pozitivi și cu polul pozitiv (hidrogenul) spre ionii negativi.

Prezența ionilor determină rearanjarea moleculelor de apă și dezorganizarea structurii lor microcristaline.

În aceste condiții, încălzirea determină cu mai mare ușurință creșterea agitației moleculare, numărul legăturilor de hidrogen care trebuie desfăcute este mai mic, temperatura crește mai repede, iar capacitatea calorică scade.

Dacă în apă sunt dizolvate molecule apolare, acestea au tendința de a accentua structura supramoleculară a apei.

În jurul fiecărei molecule dizolvate se formează o rețea mai densă de molecule de apă legate prin punți de hidrogen. Creșterea numărului de legături de hidrogen determină creșterea capacității calorice.

În afară de mercur, apa este singura dintre toate lichidele care are cea mai mare *tensiune superficială*.

3.4. APA GREA

Apa obișnuită constă din molecule de genuri diferite, construite din hidrogen și oxigen și izotopii lor grei [^{17}O , ^{18}O , deuteriu ($\text{D} = {}^2\text{H}$), tritiu ($\text{T} = {}^3\text{H}$)] combinate în diferite feluri.

Deoarece aceste molecule au însă proprietăți identice, exceptând masa, densitatea unei probe de apă este proporțională cu greutatea moleculară medie a moleculelor care o alcătuiesc.

Dacă un eșantion de apă ar consta din oxigenul obișnuit combinat numai cu deuteriu, greutatea moleculară ar fi 28 în loc de 18 și deci densitatea ar fi cu 10% mai mare decât cea a apei obișnuite.

Termenul de *apă grea* se referă de obicei la această formă a apei.

Se poate prepara apă și mai grea, izolând izotopul ^{18}O și combinându-l cu deuteriul. Această apă are o densitate cu 20% mai mare decât a apei obișnuite.

Izotopul $\text{T} = {}^3\text{H}$ combinat cu ^{18}O duce la o apă cu greutatea moleculară de 24, fiind cu 30% mai densă decât apa obișnuită.

Cea mai veche metodă practică de izolare a apei grele din apa obișnuită, constă din electroliza acesteia din urmă în prezența acidului sulfuric sau a hidroxidului de sodiu.

Din cauza supratensiunii mai mari a ionului de D^+ față de H^+ , apa grea se electrolizează cu viteză mai mică decât apa ușoară și, prin urmare, se concentrează în apa reziduală nereacționată.

Dintr-o tonă de apă obișnuită se obțin circa 10cm^3 de apă grea, de puritate de 99,99%.

Din apa grea se poate prepara hidrogenul greu, D_2 , prin electroliză sau prin oricare din metodele cunoscute de formare a hidrogenului din apă.

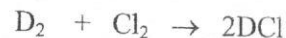
Proprietățile fizice ale apei grele se deosebesc destul de mult de ale apei obișnuite (Tabelul 3.1.):

Tabelul 3.1.

Proprietățile fizice ale apei grele

Proprietatea fizică	H_2O	D_2O
Punct de topire	$0,0^\circ\text{C}$	$3,80^\circ\text{C}$
Punct de fierbere	$100,0^\circ\text{C}$	$101,42^\circ\text{C}$
Presiune de vapori la 100°C , torr	760,0	721,2
Densitatea la 20°C , g/cm^3	0,9982	1,1056
Temperatura la care densitatea este max.	4°C	$11,6^\circ\text{C}$
Produs ionic la 25°C	$1 \cdot 10^{-14}$	$0,16 \cdot 10^{-14}$
Constanta dielectrică la 20°C	80,35	79,75
Căldura latentă de topire, cal/mol	1440	1510
Căldura de vaporizare la 25°C , cal/mol	10,484	10,743
Solubilitate: g NaCl în 100 g apă, la 25°C	35,9	30,5

Pornind de la D_2 sau D_2O se pot obține numeroase combinații chimice, care conțin în molecula lor deuteriu, de exemplu [2]:



De asemenea, au fost preparate numeroase combinații organice, conținând D în loc de H, de exemplu, CD_4 , C_6D_6 etc. Toate aceste combinații ale deuteriului au proprietăți fizice puțin deosebite de combinațiile analoage ale hidrogenului ușor.

Viermii, peștii și alte animale acvatice mor în apă grea pură, dar suportă o concentrație de apă grea mai mică de 32% [2].

Șoarecii suportă apa grea până ce aceasta atinge în corpul lor o concentrație de 20%, după care mor, manifestând sete intensă când concentrația ajunge la 40%.

Semințele plantelor nu încolțesc în apă grea.

3.5. SOLUȚIILE ÎN APĂ

Apa este un solvent mult mai bun decât cele mai multe lichide. Multe săruri cristaline și alți compuși ionici se dizolvă în apă.

Rețeaua cristalină a sărurilor este menținută de către atracțiile electrostatice foarte puternice dintre ionii pozitivi și cei negativi.

Pentru a separa acești ioni este nevoie de o energie considerabilă. Apa dizolvă cu ușurință, de exemplu, clorura de sodiu, deoarece atracția electrostatică puternică dintre dipolii apei și ionii de Na^+ și Cl^- , care conduce la formarea ionilor de Na^+ și Cl^- hidratați, foarte stabili, depășește cu mult tendința de atracție a ionilor de Na^+ și Cl^- , unul față de altul.

Datorită constantei sale dielectrice foarte mari, apa tinde să compenseze atracția electrostatică dintre ionii pozitivi și cei negativi.

Glucidele, alcoolii simpli etc., sunt ușor dizolvați de către apă datorită tendinței grupelor funcționale polare, cum sunt grupele hidroxilice ale glucidelor și alcoolilor sau a atomului de oxigen carbonilic al aldehydilor și cetonelor, de a forma legături de hidrogen cu moleculele de apă (Fig.3.6.).

Apa dizolvă sau dispersează sub formă de micle (mici particule) mulți compuși care conțin grupe polare, cât și grupe puternic nepolare (*compuși amfipatici*).

Un exemplu de compus amfipatic este oleatul de sodiu, care are o grupă

puternic nepolară și o grupă puternic polară. Acesta are o foarte slabă tendință de a se dizolva în apă și de a forma o soluție ionică adevărată. Se dispersează cu ușurință în apă, formând mici particule, în care grupele carboxil, încărcate negativ, formează legături de hidrogen cu moleculele de apă, iar lanțul hidrocarbonat nepolar, insolubil, nu formează legături de hidrogen cu apa.

Mulți componenți celulari ca proteinele, acizii nucleici, lipidele polare sunt compuși amfipatici.

La dizolvare, între moleculele substanței dizolvate și moleculele apei, se stabilesc interacțiuni și, din această cauză, proprietățile fizice și chimice ale soluțiilor sunt diferite de cele ale apei, ca și de cele ale substanței dizolvate.

Prezența substanțelor dizolvate produce modificarea structurii și a proprietăților apei lichide.

În cazul clorurii de sodiu dizolvate în apă, de exemplu, ionii de Na^+ și de Cl^- se înconjoară cu dipoli de apă și geometria așezării moleculelor de apă, în comparație cu aceea din apa pură, se modifică semnificativ. Această modificare este cu atât mai accentuată, cu cât concentrația în sare dizolvată este mai mare.

Substanțele dizolvate produc asupra solventului scăderea punctului de înghețare, creșterea punctului de fierbere sau scăderea presiunii de vapori.

Dacă se dizolvă o moleculă gram dintr-o substanță ideală, care nu disociază, nu se asociază și nu este volatilă, dizolvată într-o 1000 g de apă la presiunea de 760 mmHg, scade punctul de înghețare cu $1,86^\circ\text{C}$ și crește punctul de fierbere cu $0,543^\circ\text{C}$.

Substanțele dizolvate conferă soluțiilor proprietatea de a avea presiune osmotică.

Presiunea osmotică este o proprietate a soluțiilor, legată de cantitatea de substanță dizolvată în 1000 cm^3 de apă, nedepinzând de masa moleculară sau de sarcina electrică a acesteia [4].

Dacă se dizolvă o moleculă gram de substanță neionizabilă în 1000 cm^3 de apă și această soluție se pune în contact, printr-o membrană permeabilă numai pentru moleculele de apă, cu apă distilată, se constată că soluția are tendința de a-și mări volumul cu o forță de 22,4 atm.

Această forță poartă denumirea de *presiune osmotică*.

Presiunea osmotică are o valoare de 22,4 atm, deoarece o moleculă gram de gaz ocupă la 0°C , 22,4 l.

Dacă volumul se reduce la un litru, produsul PV fiind constant, urmează că presiunea va fi de 22,4 atm.

3.5.1. ACIDITATEA ȘI ALCALINITATEA SOLUȚIILOR

Apa pură este neutră.

Deși molecula de apă este formată prin legături covalente, o cantitate mică de molecule este ionizată.

Atomul de hidrogen cu masa sa moleculară atât de mică are un singur electron care este puternic atras de atomul de oxigen.

Ionul de hidrogen are o oarecare tendință de a se disocia de atomul de oxigen, de care este legat covalent în molecula de apă și de a se deplasa, când energia internă a fiecărei molecule este favorabilă, spre atomul de oxigen al moleculei de apă învecinate, de care se leagă printr-o legătură de hidrogen.

Moleculele ionizate conferă apei o concentrație în OH^- egală cu concentrația în H^+ . Ionul de hidrogen este captat de o moleculă de apă, iar ionizarea apei se poate scrie astfel:



În această reacție se produc doi ioni, ionul de hidroniu (H_3O^+) și ionul hidroxil (OH^-).

Într-un litru de apă pură la 25°C , în orice moment, există $1,0 \cdot 10^{-7}$ moli de ioni de H_3O^+ și o cantitate egală de ioni OH^- .

Gradul de ionizare este influențat de temperatură.

Dacă temperatura crește, numărul moleculelor ionizate este din ce în ce mai mare, determinând o creștere a concentrației în H^+ și OH^- .

De concentrația în ioni depinde conductibilitatea electrică.

Măsurători foarte exacte arată că în apa pură, la 25°C, raportul dintre produsul concentrațiilor ionilor de H^+ și OH^- și concentrația în molecule neionizate este de $1,8 \cdot 10^{-16}$:

$$K = \frac{C_{H^+} \cdot C_{OH^-}}{C_{H_2O}} = 1,8 \cdot 10^{-16}$$

unde K este constanta de ionizare.

Constanta de ionizare este extrem de mică, ceea ce înseamnă că numărul moleculelor ionizate este foarte mic față de numărul moleculelor neionizate. Din această cauză, concentrația moleculelor neionizate poate fi considerată constantă.

Cum concentrația molară a apei este de 55,56 molecule gram la un volum de un litru, rezultă că:

$$C_{H^+} \cdot C_{OH^-} = K \cdot C_{H_2O} = 1,8 \cdot 10^{-16} \cdot 55,56 = 1 \cdot 10^{-14}$$

Produsul concentrației ionilor sau *produsul ionic* al apei este la 25°C de $1 \cdot 10^{-14}$.

Dacă în apă se dizolvă un acid tare,



crește concentrația molară a ionilor de hidrogen și scade concentrația în ioni de hidroxil, deoarece produsul ionic al apei rămâne constant pentru aceeași temperatură.

Dacă în apă se dizolvă o bază tare,



crește concentrația în ioni de hidroxil, deci scade concentrația în ioni de hidrogen.

Disocierea apei este un proces în echilibru:



a cărui constantă de echilibru este:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

parantezele indicând concentrația în moli la litru.

Mărimea constantei de echilibru, la o temperatură dată, poate fi calculată prin determinările de conductivitate a apei distilate pure.

Concentrația în apă a apei pure este foarte mare și ea se consideră egală cu numărul de grame de apă dintr-un litru împărțit la masa moleculară a apei, adică, $1000/18 = 55,5$ M.

Deoarece concentrația ionilor de H^+ și OH^- este foarte mică, de $1 \cdot 10^{-7}$ la 25°C, concentrația molară a apei nu este modificată semnificativ de către slaba ei ionizare.

Expresia constantei de echilibru poate fi simplificată astfel:

$$55,5 K = [H^+][OH^-]$$

iar termenul 55,5K poate fi înlocuit printr-o constantă generală K_w , numită *produsul ionic* al apei și formula de mai sus devine:

$$K_w = [H^+][OH^-]$$

Valoarea K_w la 25°C este de $1,0 \cdot 10^{-14}$.

Într-o soluție acidă, concentrația H^+ este relativ mare, iar concentrația OH^- scăzută corespunzător.

Într-o soluție alcalină situația este inversă.

K_w , produsul ionic al apei, stă la baza scării de pH (tabelul 3.2.) [1].

Tabelul 3.2.

Scara de pH

$[H^+]$, M	pH	$[OH^-]$, M
1,0	0	10^{-14}
10^{-1}	1	10^{-13}
10^{-2}	2	10^{-12}
10^{-3}	3	10^{-11}
10^{-4}	4	10^{-10}
10^{-5}	5	10^{-9}
10^{-6}	6	10^{-8}
10^{-7}	7	10^{-7}
10^{-8}	8	10^{-6}
10^{-9}	9	10^{-5}
10^{-10}	10	10^{-4}
10^{-11}	11	10^{-3}
10^{-12}	12	10^{-2}
10^{-13}	13	10^{-1}
10^{-14}	14	1,0

Sørensen S.P.L. a definit termenul de pH ca fiind:

$$pH = \lg_{10} \frac{1}{[H^+]} = -\lg_{10} [H^+]$$

Într-o soluție complet neutră, la 25°C:

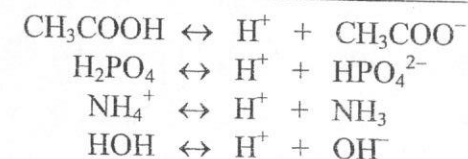
$$[H^+] = [OH^-] = 1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

pH-ul unei astfel de soluții este:

$$pH = \lg \frac{1}{1 \cdot 10^{-7}} = 7,0$$

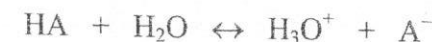
După Brönsted J. N. și Lowry T. M., un acid este un donator de protoni și o bază este un acceptor de protoni (Fig.3.7.).

Fig.3.7. Perechi de acid – bază conjugate



O reacție acid–bază implică întotdeauna o pereche acid–bază conjugată, formată dintr-un donator de protoni și un acceptor de protoni. De exemplu, acidul acetic este un donator de protoni, iar ionul acetat este un acceptor de protoni.

Ionizarea unui acid (HA) în soluție apoasă diluată implică transferul unui proton de la acid la apă, care acționează ca acceptor de protoni pentru a forma acidul H_3O^+ :



Acizii care au o slabă tendință de a elibera protoni în apă sunt acizi slabi, iar acizii care eliberează protoni cu ușurință sunt acizi tari.

Acțiunea de disociere a oricărui acid este exprimată prin constanta de disociere la o anumită temperatură:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA][H_2O]}$$

unde, parantezele indică concentrația în moli la litru.

Se obișnuiește să se simplifice această expresie prin eliminarea apei necesare pentru hidratarea unui proton [1]:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Constantele de disociere ale soluțiilor apoase ale diferitelor substanțe, la o anumită concentrație și tărie ionică, se numesc *constante aparente* sau *constante de disociere pentru concentrație* și se notează cu K' , pentru a se deosebi de adevărata constantă sau *constantă de disociere termodinamică* K [1].

Se menționează expresia pK' , care reprezintă o exprimare logaritmică a lui K , așa cum termenul pH este transformarea logaritmică a lui $[H^+]$:

$$pK' = \lg \frac{1}{K'} = -\lg K'$$

Constantele de disociere aparentă ale unor acizi și baze sunt trecute în tabelul 3.3. [1].

Tabelul 3.3.

Constante de disociere aparentă, K' și pK' unor acizi și baze.

Acidul sau baza	$K' \cdot M$	pK'
HCOOH	$1,78 \cdot 10^{-4}$	3,75
CH ₃ COOH	$1,74 \cdot 10^{-5}$	4,76
CH ₃ CH ₂ COOH	$1,35 \cdot 10^{-5}$	4,87
CH ₃ CHOHCOOH	$1,38 \cdot 10^{-4}$	3,86
H ₃ PO ₄	$7,24 \cdot 10^{-3}$	2,14
H ₂ CO ₃	$1,70 \cdot 10^{-4}$	3,77
NH ₄ ⁺	$5,62 \cdot 10^{-10}$	9,25
CH ₃ NH ₃ ⁺	$2,46 \cdot 10^{-11}$	10,60

3.6. APA CA SOLVENT

Apa este cel mai important dintre toți solvenții din natură sau dintre cei utilizați în tehnică.

Apa dizolvă electroliți (acizi, baze, săruri) formând soluții în care acești compuși sunt în stare ionizată. De asemenea, apa dizolvă numeroase substanțe organice și anorganice, care conțin atomi capabili de a forma legături de hidrogen cu moleculele apei [2].

În soluții apoase au loc numeroase reacții.

Se menționează doar reacțiile biochimice din organismele vii, care în ansamblul larg constituie viața.

Sărurile sunt solubile în apă și insolubile în majoritatea solvenților organici, deoarece apa are o constantă dielectrică foarte mare (80,08 la temperatura camerei) și moleculele sale tind să se combine cu ionii pentru a forma hidrați. Aceste două proprietăți sunt legate de momentul electric mare de dipol a moleculei de apă.

Forțele de atracție sau repulsie ale sarcinilor electrice sunt invers proporționale cu constanta dielectrică a mediului care înconjoară sarcinile. De aceea, două sarcini electrice opuse aflate în apă se atrag reciproc cu o forță de 80 de ori mai mică decât cea corespunzătoare în aer sau în vid. Astfel, de exemplu, ionii unui cristal de clorură de sodiu în apă se vor disocia mult mai ușor din cristal decât dacă cristallul ar fi în aer, deoarece forța electrostatică care aduce înapoi un ion pe suprafața cristallului, în soluție apoasă, este de numai 1/80 din cea corespunzătoare în aer [3].

Stabilizarea ionilor dizolvați în apă se datorește formării hidraților ionilor. Fiecare ion negativ atrage capetele pozitive ale moleculelor de apă adiacente și tinde să rețină câteva molecule de apă.

Ionii pozitivi, care, de obicei, sunt mai mici decât ionii negativi, manifestă acest efect și mai puternic: fiecare ion pozitiv atrage capetele negative ale moleculelor de apă și leagă strâns de ele diferite molecule, formând un hidrat [3], care poate avea o stabilitate considerabilă, în special la cationii bivalenți și trivalenți.

Numărul moleculelor de apă care se atașează la un cation este determinat de mărimea cationului. Cationul Be^{2+} formează un tetrahidrat, $\text{Be}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$, ioni ceva mai mari ca Mg^{2+} , Al^{3+} formează hexahidrați, $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ sau $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$.

Forțele dintre cationi și moleculele de apă sunt deosebit de puternice, motiv pentru care ionii din cristale deseori rețin un strat de molecule de apă, numit apă de cristalizare.

Acest efect este mai pronunțat la ionii bivalenți și trivalenți: $\text{BeCO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSiF}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ etc. În alaun, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, șase din cele 12 molecule de apă sunt coordonate în jurul ionului de aluminiu, iar celelalte șase în jurul ionului de potasiu.

Hidratarea se datorește formării unor legături de hidrogen în cazul substanțelor neionice, sau a unor atracții ion-dipoli, când solvitul este compus din ioni.

În soluțiile compuşilor ionici, ionii de semn contrar rămân, în mare măsură, despărțiți, în primul rând, din cauza constantei dielectrice mari a apei și de puterea mare a acesteia de a solvata ionii. Fiecare ion se înconjoară cu o atmosferă de molecule de apă.

Moleculele de apă, datorită momentului lor electric ($\mu = 1,84\text{D}$) sunt orientate, în cazul cationilor, cu oxigenul (polul negativ) spre ion, iar în cazul anionilor, cu atomul de hidrogen (polul pozitiv) spre ion. În aceste interacții, solvit-solvent, se degajă călduri de hidratare însemnate.

Un ion se solvatează cu atât mai puternic, cu cât volumul ionului este mai mic și sarcina electrică mai mare.

Hidrații. Purificarea unor substanțe solide se poate face prin cristalizarea dintr-un solvent, depunându-se în formă anhidră sau sub formă de cristale care conțin apă de cristalizare.

Substanțele care conțin apă de cristalizare se numesc *hidrați*.

Din apă cristalizează în stare anhidră puține substanțe, dintre care, unele halogenuri (NaCl , NaBr , KI , CsI), substanțe organice ca zaharina etc. Majo-

ritatea electroliților și multe substanțe neionice, anorganice și organice, formează hidrați.

Hidrații sunt stabili numai în stare solidă. Prin îndepărtarea apei, se transformă în substanțe anhidre și rețeaua cristalină a hidraților se năruiește.

Moleculele de apă de cristalizare fac parte integrantă din rețelele cristaline ale hidraților. Hidrații compuşilor macromoleculari (proteinele, silicații) includ apă în interstițiile rețelei lor, care în unele cazuri se dilată, fără a se modifica esențial.

Higroscopicitate. Delicvescență. Eflorescență. Dacă se lasă clorură de calciu anhidră (CaCl_2) la aer, fiind o substanță *higroscopică*, absorbe vapori de apă din atmosferă, trecând în $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, apoi în $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și apoi în $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Unii hidrați, printre care și $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lăsați la aer, continuă să absoarbă apă, transformându-se într-o soluție concentrată. Asemenea substanțe sunt *delicvescente* [5].

Hidrații bogați în apă, cum este $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ sau $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ lăsați la aer, pierd o parte din apa lor de cristalizare, iar cristalul se distruge, transformându-se într-o pulbere. Se produce *eflorescență*.

Proprietatea unei substanțe de a fi delicvescentă sau eflorescentă la aer este determinată de presiunea vaporilor de apă din atmosferă, presiunea de vapori a hidratului și presiunea de vapori a soluției saturate.

O substanță este delicvescentă când presiunea de vapori a soluției saturate este mai mică decât cea a vaporilor de apă din atmosferă.

Hidratul unei substanțe devine eflorescent când presiunea lui de vapori este mai mare decât cea a vaporilor de apă din atmosferă [2].

Echilibrul gheață-apă-vapori. Sub temperatura de 0°C presiunea de vapori a apei (gheții) este mică și ea continuă să scadă cu temperatura.

Diagrama de fază apă-gheață-vapori (Fig.3.8.) conține trei curbe de echilibru (OA, OB și OC) care delimitează cele trei faze posibile ale sistemului: solid-lichid-vapori.

Pentru fiecare presiune dată, sistemul este în echilibru numai la o anumită temperatură. Așa de exemplu, pentru presiunea de 760 torr, temperatura de

echilibru gheață-apă este 0°C , iar temperatura de echilibru apă-vapori este de 100°C .

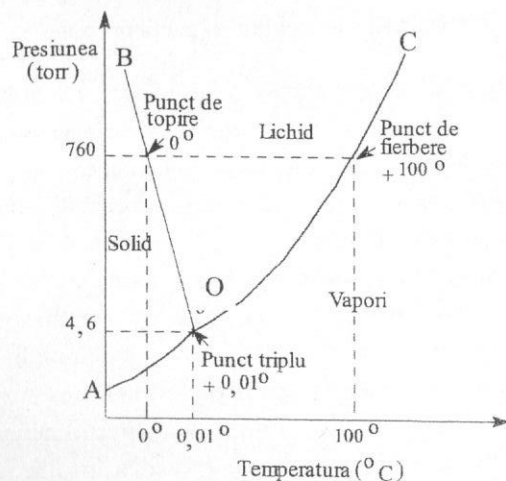


Fig.3.8. Diagrama de faze apă-gheață-vapori

Curba OA reprezintă echilibru gheață-vapori. După cum se vede din diagramă, la diferite temperaturi și presiuni interdependente, pot exista câte două faze în echilibru: solid-lichid, lichid-vapori sau solid-vapori.

Există un singur punct, *punctul triplu*, la care pot coexista cele trei faze, gheață, apă și vapori. La apă, punctul triplu este la $0,01^{\circ}\text{C}$ și 4,6 torr [2].

3.7. APA BIOLOGICĂ

Cercetări recente au ajuns la concluzia că apa naturală distilată este formată din trei componente: *apă neutrală* 998 de părți și 2 părți *apă biologică* și *apă antagonică*.

Proporția dintre apa biologică și apa antagonică depinde de proveniență. Se pare că izvoarele din zonele vulcanice conțin cel mai mare procentaj de apă biologică.

În natură, există posibilitatea de a se forma următoarele forme de apă din:

- hidrogen ușor cu oxigen ușor;
- hidrogen ușor cu oxigen 17;
- hidrogen ușor cu oxigen 18;
- hidrogen greu cu oxigen ușor;
- hidrogen greu cu oxigen 17;
- hidrogen greu cu oxigen 18 și de asemenea, cu încă trei forme de apă radioactivă (combinații ale tritiului cu oxigen 16, 17 sau 18).

Pentru explicarea anomaliei privitoare la densitatea apei, există și ipoteza că apa pură este, în fapt, un amestec de apă solidă (gruparea moleculelor de apă ca într-un polimer) și apă lichidă (solvent) cu formula H_2O .

Apa biologică și apa antagonică nu se identifică cu formele de apă menționate mai sus; structura lor este polimoleculară și asimetrică; ele se structurează în formă de elice dublă cu atomii de oxigen legați pe generatoare și cei de hidrogen pe spirală, ceea ce reamintește de dubla elice a acidului dezoxiribonucleic (ADN).

Apa biologică are orientarea elicei într-o direcție, iar apa antagonică are orientarea elicei în sens invers.

Apa biologică are un pH care se apropie și uneori se identifică cu pH-ul celulei vii. Valoarea pH-ului variază de la 7,0 până la 8,5–9,0 (pH-ul mediului biologic este de 7,2–7,4). PH-ul apei antagonice este mult sub 5,5.

Proporțiile cantitative ale apei biologice și a celei antagonice în diferitele organe dă pH-ul organului respectiv. Se pare că apa din izvoarele zonei de păduri de fag este cea mai bună de băut. În această apă concentrația de apă biologică și apă antagonică, față de apa neurală, este optimă pentru procesele biologice, ca și raportul dintre apa biologică și cea antagonică.

Picăturile de apă biologică văzute la microscop se constată că oscilează (pulsează). Frecvența acestor pulsații depinde de temperatură.

Apa biologică fierbe la 105°C , îngheață mai jos de 0°C .

Aceasta este confirmat și de faptul că seva plantelor nu îngheață la 0°C . Seva plantelor conține multă apă biologică, dar când este extrasă, în contact cu atmosfera se transformă.

Celulele nu folosesc apa neutrală, ci apa biologică și apa antagonică.

Structura cristalelor de apă biologică și apă antagonică diferă de structura cristalelor de apă obișnuită.

Din punct de vedere electric, datorită vibrațiilor sale naturale, în soluțiile de apă biologică apar efecte de oscilație (pulsatii electrice) cu maxime și minime de amplitudine. Oscilațiile continue ale apei biologice depind de proprietatea ei esențială de a capta și de a reemite instantaneu acea formă de energie care circulă în univers și care constituie izvorul energetic al întregii noastre existențe. Caracteristicile apei sunt diferite de acelea ale apei biologice, care intră în contact cu foarte multe specii chimice care alcătuiesc organismele vii și cu o mare diversitate de interfețe biologice.

Apa joacă, în acest context, o multitudine de roluri, ca de exemplu: stabilizarea prin legături intra- și intermoleculare a lanțurilor proteice α , β , γ (vezi volumul al III-lea al tratatului), stabilizarea dublului helix a ADN, stabilizarea/modificarea configurațională și funcțională a multor componente celulare și tisulare, reglarea cineticii în biocatalizele enzimatic, determină specificitatea și proprietățile structurilor biocompozite (vezi subcapitolul 2.4.), în biomembrane, în procesele de hidratare, alături de GAG absorbant de șocuri în lichidul sinovial (vezi subcapitolul 2.4.2.4.) etc.

Biman Bagchi a subliniat faptul că se pot evidenția, la apă biologică, câteva însușiri, care o deosebesc de apa neutrală, responsabile pentru comportările ei particulare în prezența biomoleculilor, a celulelor, *in vivo* [11]:

- Apa biologică nu poate realiza structuri tetraedrice ca acelea ilustrate în Fig.3.4. ci numai legături binare între diverse biomolecule, motiv pentru care, poate avea în vecinătate maximum patru alte molecule de apă cu care să interacționeze;
- Apa biologică poate exista sub două forme: *apă legată* prin legături de hidrogen de grupe încărcate electric ale biomoleculilor cu care vine în contact și *apă liberă* care vine în contact cu interfețele neîncărcate, nepolarizate și care nu au capacitatea de a forma legături de hidrogen;
- Dinamica moleculelor de apă biologică diferă, de la caz la caz, în funcție de partenerii anturajului chimici și este mult redusă față de dinamica moleculelor de apă neutrală;

- Densitatea apei biologice poate fi diferită în diverse anturaje și structuri ierarhizate, mai mult sau mai puțin funcționalizate.

Între apa legată și apa liberă, în sistemele biologice, există un echilibru dinamic, *apă legată* $\leftrightarrow$ *apă liberă*. Legarea și dezlegarea moleculelor de apă de proteine sau de proteoglicani implică și o anumită cantitate de energie.

În cartilajul articular, proteoglicanii sunt capabili să lege o mare cantitate de apă, crescând semnificativ valoarea presiunii osmotice.

GAG se dispun perpendicular pe lanțul proteic imitând structura unei perii, care găzduiește apa liberă, în stare de repaos, și o elimină la solicitări mecanice externe. Procesul este perfect reversibil. Apa are posibilitatea de a se deplasa sub sarcină sau deformare și contribuie la disiparea stresului în țesut (vezi subcapitolul 2.4.2.6.). Sarcina furnizează, indirect, energia de rupere a legăturilor de hidrogen, apa biologică legată trecând în apă liberă.

În mod similar, biocompozite ca osul, lemnul sau cochilele moluștelor reacționează la factori de stress mecanic, între elementele structurale intime rupându-se și refăcându-se progresiv legăturile de hidrogen.

Biopolimerii devin cazați în absența hidratării. Apa biologică este indispensabilă biosintezei, organizării extracelulare și agregării proteinelor (vezi capitolul 12, Proteine fibroase).

Mierea de albine conține apă biologică.

Alături de atributul de *solvent al vieții*, apa a mai fost numită *vehicul al schimbărilor naturale* (Leonardo da Vinci) și *lubrifianțul vieții*.

Bibliografie selectivă

1. Lehninger A.L., *Biochimie*, vol.I, Editura Tehnică, București, 1987
2. Nenițescu C.D., *Chimie generală*, Editura Did. și Pedagogică, București, 1979
3. Pauling L., *Chimie generală*, Editura Științifică, 1972
4. Chiriță Gh., Chiriță M., *Chimia Pielii*, ed. II, Editura I.P.Iași, 1987
5. Nenițescu C.D., *Chimie organică*, vol.I, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980

6. Cotăescu I., *Materia vie*, Editura Științifică, București, 1968
7. Franks F. (Ed.), *Water*, A Comprehensive Treatise, Plenum Press, New York, 1972 – 1982
8. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu – Gheorghiu, *Biochimie medicală*, Editura Medicală, București, 1980
9. Neufeld D., Melnick G., The Harvard University Gazette, 23 April 1998
10. Jones O.A., Lester J.N., Voulvoulis N., *Biotechnology*, 23 (4), 2005
11. Bagchi B., *Water in biological and chemical processes*, Cambridge University Press, 2013
12. Keutsch F.N., Saykally R.J., *Water clusters: untangling the mysteries of the liquid, one molecule at a time*, Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 2001
13. Chiriță M., *Fenomene de transfer în bioinginerie medicală*, Note curs, 2016
14. Laageand D., J.T.Hynes, *A molecular jump mechanism of water reorientation*, Science, 311, 2006
15. J.P. Arroyo, A.J.Schweickert, *Back to Basics in Physiology*, Academic Press, 2013
16. *Water Research*, 2016
<https://www.elsevier.com/search-results?query=biological+water&labels=all>
17. S. Ahuja, *Chemistry and Water*, Elsevier Science, 2016
18. *Chemistry and Biology of Water, Air and Soil*, Ed.J. Tölgyessy, Elsevier Science, 2016

PARTEA a IV-a

CAPITOLUL 4

4. ZAHARURI

4.1.	Introducere	484
4.2.	Monozaharide	484
4.2.1.	Proprietățile fizice și chimice ale monozaharidelor	490
4.2.2.	Monozaharide mai importante	492
4.3.	Oligozaharide	494
4.4.	Polizaharide	497
4.4.1.	Polizaharide de rezervă	498
4.4.2.	Polizaharide de structură	502
4.5.	Glicoproteide	506
4.5.1.	Mucopolizaharide	509
4.5.1.1.	Acidul hialuronic	510
4.5.1.2.	Condroitina, condroitin 4 sulfatul, condroitin 6 sulfatul	511
4.5.1.3.	Sulfatul de dermatan	512
4.5.1.4.	Heparina, sulfatul de heparină	513
4.5.1.5.	Sulfatul de keratan	514
4.5.1.6.	Hidratarea mucopolizaharidelor	514
	<i>Bibliografie</i>	517

4.1. INTRODUCERE

Zaharurile sau zaharidele sau glucidele sau hidrații de carbon sunt o clasă de polihidroxi-aldehide, polihidroxi-cetone și unii derivați de ai acestora. Numele de hidrați de carbon vine de la faptul că principalii reprezentanți ai clasei, ca de exemplu, glucoza, $C_6H_{12}O_6$ sau celuloza, $(C_6H_{10}O_5)_n$, au formula generală $C_n(H_2O)_m$ a unor presupuși hidrați de carbon.

Hidrații de carbon sunt cea mai răspândită materie organică din biosferă, datorită abundenței din lumea plantelor a celor doi polimeri ai D-glucozei, amidonul și celuloza. În cele mai multe plante amidonul este forma principală de stocare a energiei, iar celuloza este componentul principal structural extracelular din pereții rigizi ai celulelor țesuturilor fibroase și lemnoase.

Glicogenul, care are o structură asemănătoare cu cea a amidonului este principalul hidrat de carbon de rezervă la animale. Alte polizaharide sunt componente ale învelișurilor moi ale țesuturilor animale și ale peretelui celular bacterian.

Hidrații de carbon se împart în: *monozaharide*, *oligozaharide* și *polizaharide*.

4.2. MONOZAHARIDE

Monozaharidele sau hidroxi-aldehidele sau hidroxi-cetonele au grupa carbonil în parte modificată, prin formare de semiacetali interni.

Monozaharidele pot fi considerate ca produși de oxidare ai poliolilor alifatici simpli ca: glicerolul ($CH_2OH-CHOH-CH_2OH$), tetritolii [$CH_2OH-(CHOH)-(CHOH)_2-CH_2OH$], pentitolii [$CH_2OH-(CHOH)_3-CH_2OH$] și hexitolii [$CH_2OH-(CHOH)_4-CH_2OH$] în care o grupă de alcool primar este oxidată la aldehydă sau una de alcool secundar la cetonă. După această definiție, cea mai simplă monozaharidă este *glicolaldehida* ($HOCH_2CHO$).

După numărul de atomi de carbon din moleculă, monozaharidele se împart în *trioze*, *tetroze*, *pentoze*, *hexoze* etc.

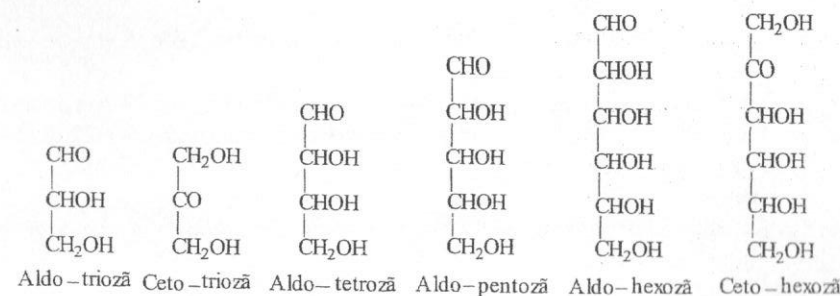


Fig.4.1. Aldoze și cetoze

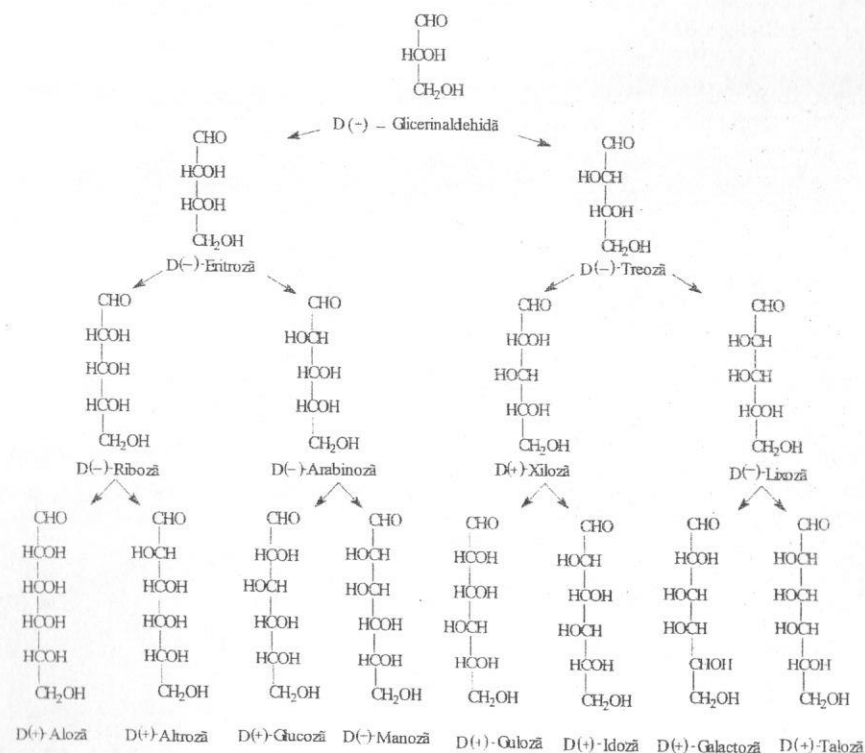


Fig.4.2. Seria D a aldazelor

După funcția grupei carbonil se disting *aldoze* și *cetoze*. De la glicerol va deriva o aldo-trioză, *glicerolaldehida* și o ceto-trioză, *dihidroxiacetona*. În mod asemănător de la poliolii mai înalți rezultă aldoze și cetoze (Fig.4.1.).

Fiecare grupă CHOH din formulele prezentate în Fig.4.1. are atomul de carbon asimetric. Pentru fiecare atom de carbon asimetric vor exista doi enantiomeri. În cazul de față, vor fi 2 aldo-trioze, 4 aldo-tetroze, 8 aldo-pentoze, 16 aldo-hexoze stereoizomere.

Întrucât cetozele au cu un atom de carbon asimetric mai puțin decât aldozele, vor exista deci o ceto-trioză, 2 ceto-tetroze, 4 ceto-pentoze și 8 ceto-hexoze. În Fig.4.2. sunt prezentate formulele aldazelor din seria D și în mod analog se poate deduce schema pentru seria L, ca și formulele seriilor D și L pentru cetoze [1].

Glicerinaldehida și tetrozele nu se găsesc în natură.

Triozele și heptozele sunt intermediari însemnați în metabolismul glucidic. Pentozele și hexozele sunt cele mai importante dintre monozaharide. Unele dintre ele se găsesc în natură, în cantități uriașe, în stare liberă sau combinată.

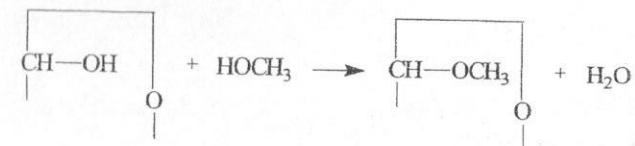
Aldopentozele sunt componente ale acizilor nucleici și a diferitelor polizaharide.

În soluție apoasă, monozaharidele se comportă ca și cum ar avea un centru de asimetrie în plus față de cel prezentat în formulele structurale din Fig.4.2.

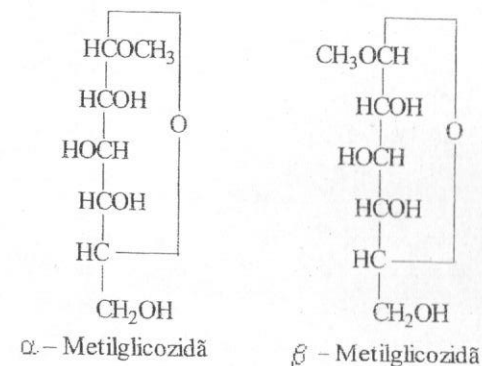
D-glucosa poate exista în două forme izomere, care diferă prin rotația specifică, α -D-glucosa cu $[\alpha]^{20}_D = +122,2^0$ și β -D-glucosa cu $[\alpha]^{20}_D = +18,7^0$. Cei doi izomeri au aceeași compoziție elementară, dar proprietățile lor fizice și chimice sunt diferite. Când izomerii α și β ai D-glucosei sunt dizolvați în apă, rotația optică a fiecăruia se modifică treptat și se ajunge la un echilibru la valoarea $[\alpha]^{20}_D = +52,7^0$; are loc schimbarea numită *mutarotație*, care se datorește formării la 20^0C a unui amestec de $1/3$ α -D-glucoză și $2/3$ β -D-glucoză, care este în echilibru [2].

Prin încălzirea unei aldoze cu un alcool inferior (metanol, etanol), în prezență de acid clorhidric (1-3%), se obțin derivați cristalizați, cu caracter de acetali, numiți *glicozide*. Aceste combinații se produc prin esterificarea hidroxilului glicozidic, o reacție analoagă cu transformarea unui semiacetal într-un

acetal:



În reacția de mai sus, aplicată la D-glucoză, se formează două glicozide izomere, una provenind de la α -glucoză și alta de la β -glucoză [1]:

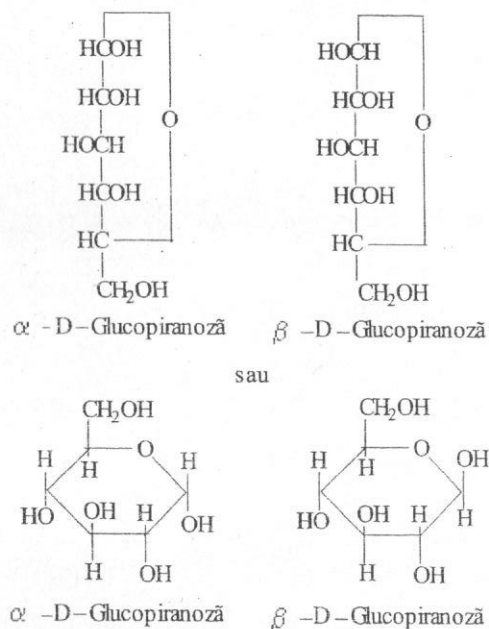


Din considerații chimice, s-a ajuns la concluzia că izomerii α și β ai D-glucosei nu au o structură deschisă ca în Fig.4.2., ci una ciclică, formată prin reacția grupării hidroxil de la carbonul 5 cu gruparea aldehydică de la carbonul 1. Ciclul din șase atomi de carbon ce se formează, poartă numele de ciclu *piranoic*, de la compusul heterociclic *piran*.

Numele ciclului de α -D-glucoză este α -D-glucopiranoză Fig.4.3.

Formarea ciclului de piranoză este rezultatul unui tip mai general de reacție dintre o aldehydă și un alcool, ducând la obținerea unui *semiacetal*, care conține un atom de carbon asimetric care poate exista sub două forme stereoizomere denumite α și β (Fig.4.4.).

În structura rezultată, grupa carbonil este mascată și în locul ei apare o nouă grupă hidroxil, numită *hidroxil glicozidic*.

Fig.4.3. Formele α și β ale D-glucopiranozei

Formele izomere ale monozaharidelor, care diferă doar prin configurația atomului de carbon carbonilic se numesc *anomeri*, iar atomul de carbon, *carbon anemic*.

Semicetalul este produsul rezultat din reacția dintre o cetonă și un alcool.

În cetonele cu cinci sau mai mulți atomi de carbon gruparea hidroxil de la atomul de carbon 5 reacționează cu gruparea carbonilică de la atomul de carbon 2 formând un ciclu de cinci atomi de carbon, *ciclul furanozic* derivat al furanului. Ciclul format de D-fructoză este α -D-fructofuranoză (Fig.4.5).

Pentru a se evidenția structurile ciclice ale monozaharidelor s-au adoptat *formulele de proiecție* W.N. Haworth, în care ciclul piranozic sau furanozic este imaginat perpendicular pe planul hârtiei.

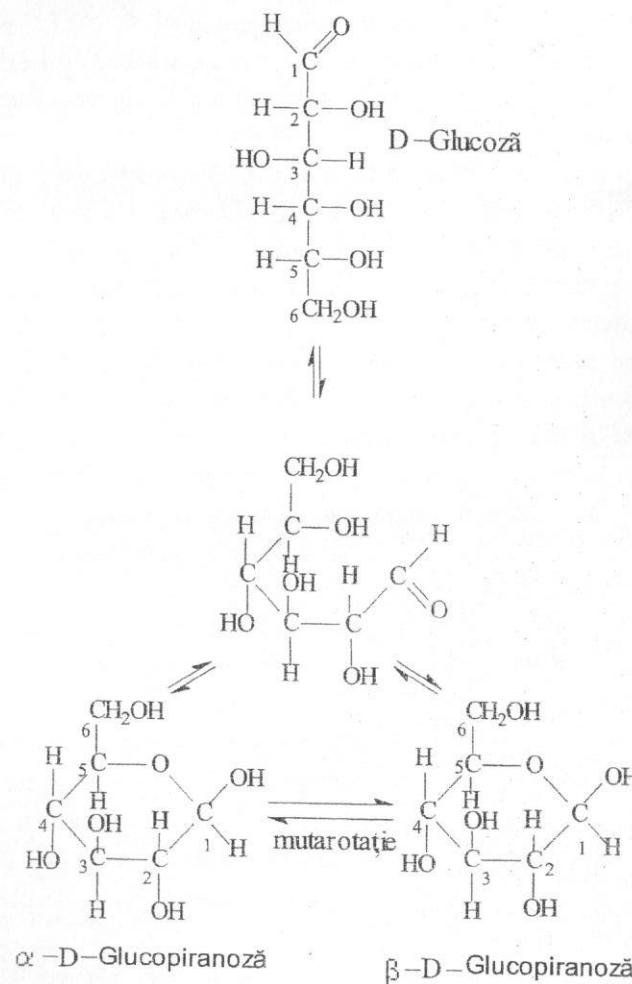


Fig.4.4. Formarea ciclului piranoză la glucoză

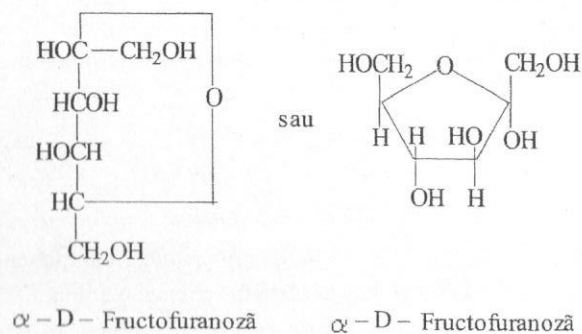
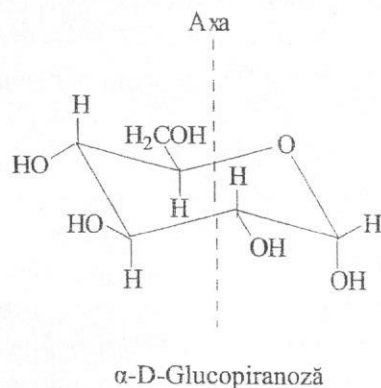


Fig.4.5. Ciclul furanozic

Aceste proiecții sunt întrucâtva eronate deoarece sugerează că ciclurile furanozice și piranozice sunt plane, ceea ce nu este exact :

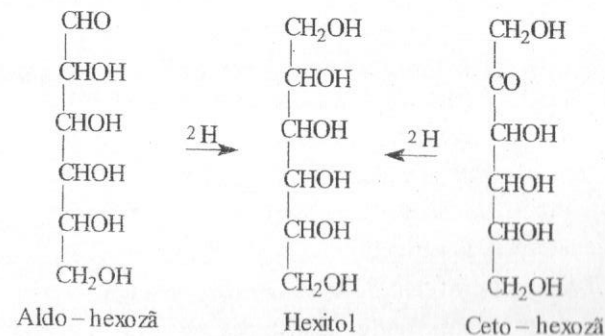


4.2.1. PROPRIETĂȚILE FIZICE ȘI CHIMICE ALE MONOZAHARIDELOR

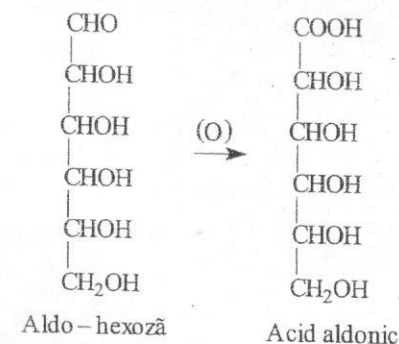
Monozaharidele și mai ales pentozele și hexozele sunt substanțe incolor, cristalizate și nu pot fi distilate fără descompunere. Derivații lor, în care grupele hidroxilice sunt blocate, cum sunt eterii metilici, pot fi distilați la vid.

Din cauza numeroaselor grupe hidroxilice din moleculă, monozaharidele sunt ușor solubile în apă, greu solubile în alcool etilic și insolubile în eter etilic, cloroform și în hidrocarburi.

Din tetroze se formează *tetritoli*, din pentoze, *pentitoli*, din hexoze, *hexitoli* :



La tratarea blândă a aldozelor cu apă de clor sau de brom se oxidează grupa aldehidică și se obțin *acizi aldonic* :



Monozaharidele sunt stabile la fierberea cu soluții diluate de acizi minerali, iar soluțiile acide concentrate produc deshidratarea glucidelor cu formare de derivați aldehydici de la furan denumiți *furfurali*.

Soluțiile diluate de baze determină, la temperatura camerei, o rearanjare în jurul atomului de carbon anomic și a atomului de carbon adiacent.

Astfel, la tratarea D-glucizei cu soluții diluate de baze duce la izomerizarea sa, cu formarea unui amestec de D-glucoză, D-fructoză și D-manoză.

Monozaharidele, prin reducere, se transformă în alcooli polihidroxilici.

Din D-glucoză, prin oxidare, se obține *acidul gluconic*, din manoză, *acidul manonic*. Acizii aldonici dau reacțiile specifice hidroxiacizilor alifatici. În apă sunt ușor solubili, la fel ca și sărurile lor.

Gluconatul de calciu este utilizat ca medicament.

Oxidarea energetică a aldazelor cu acid azotic concentrat duce la acizi dicarboxilici (*acizi zaharici*), în care cei doi atomi de carbon terminali ai aldazei sunt transformați în carboxili.

Acizii zaharici proveniți de la aldohexoze $[HOOC - (CHOH)_4 - COOH]$ se deosebesc între ei prin configurația sterică.

Hidroxilul glicozidic al monozaharidelor se *eterifică* prin tratare cu alcool etilic în prezența unei mici cantități de acid clorhidric gazos, obținându-se *glicozide*.

Celelalte grupe hidroxilice din moleculă nu reacționează în aceste condiții. Ele se pot metila cu iodură de metil în prezența oxidului de argint sau cu sulfat de metil în prezența hidroxidului de sodiu.

Grupele alcoolice metilate sunt foarte rezistente la hidroliză.

Grupele hidroxilice din monozaharide pot fi ușor *esterificate* cu anhidridă acetică (*acetilare*) în prezența bazelor. Esterii formați se pot hidroliza regenerându-se monozaharidul inițial, folosindu-se o soluție de amoniac în alcool etilic sau metoxid de sodiu în cloroform, din cauza sensibilității monozaharidelor față de baze.

4.2.2. MONOZAHARIDE MAI IMPORTANTE

Dintre monozaharidele mai importante, se menționează: *triozele*, *tetrozele*, *pentozele*, *hexozele*, *heptozele*.

Triozele nu se găsesc în natură în stare liberă, dar esterii lor cu acidul fos-

foric sunt intermediari importanți în transformările biochimice ale hidraților de carbon.

Din cele opt aldo-pentoze numai patru se găsesc în natură [*D (+)-xiloza*, *D (-)-arabinoza*, *L (+)-arabinoza*, *D (-)-riboza*] și din cele patru ceto-pentoze numai două se găsesc în natură (*D-ribuloza* și *L-xiluloza*).

D (+)-Xiloza este răspândită în natură fiind o componentă a gumelor vegetale, iar sub formă de *xilan* se găsește în lemn ca o componentă a hemicelulozei, în paie, coceni de porumb, coji de semințe de bumbac și în semințe de floarea soarelui.

(-)-Arabinoza se găsește rar în natură ca o componentă a unor glucide. *L (+)-Arabinoza* este mult răspândită în vegetale sub forma unei polizaharide numită *araban*, precum și ca o componentă a gumelor, mucilagiilor vegetale, a hemicelulozei, a unor glucide și dizaharide.

D (-)-Riboza alături de *dezoxi-D-riboză* este o componentă a acizilor nucleici, legată glicozidic de anumiți derivați ai pirimidinei și purinei și de acid fosforic. *D-Ribuloza*, o ceto-pentoză, are un rol important în asimilația dioxidului de carbon și în degradarea aerobă a hidraților de carbon. *L-Xiluloza* este o ceto-pentoză care a fost identificată în urina bolnavilor de pentozurie.

Aldo-hexozele cu cei patru atomi de carbon asimetrici ai lor, există sub forma a 16 izomeri optici, astăzi toți cunoscuți. Ceto-hexozele, cu trei atomi de carbon asimetrici pot forma opt izomeri optici. Hexozele cele mai importante sunt: *D-gluciza*, *D-manoza*, *D-galactoza* și *D-fructoza*, care sunt și cele mai răspândite monozaharide.

D (+)-Gluciza este cel mai important monozaharid, mai ales pentru fiziologia animală și vegetală. În stare liberă se găsește în fructe, flori, mierea de albine, se găsește combinată cu ea însăși sau cu alte monozaharide (maltoza, lactoza, zaharoza, celobioza), în polizaharidele cele mai importante, amidonul și celuloza, precum și în nenumărate glicozide. Din toate aceste combinații, *D-gluciza* se obține prin hidroliză cu acizi sau enzime.

În regnul animal, *D-gluciza* se găsește în sânge în concentrație de 0,1%.

Sub această limită a concentrației apar tulburări. În boala numită diabet, *D-gluciza* este în concentrație mărită în sânge și în urină.

D-glucosa se prepară industrial din amidon prin hidroliză cu acid clorhidric diluat în autoclavă la 2 atm.

D-glucosa cristalizată din apă este de forma α . Prin recristalizare, din soluție diluată de acid acetic, se obține β -glucosa cristalizată. Aceasta nu este stabilă deoarece urmele de apă o transformă în α -glucoză.

D(+)-Manoza nu se găsește liberă în natură, ci în polizaharidele ei, mananii.

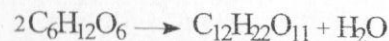
D(+)-Galactosa nu se găsește în natură în stare liberă decât rar, dar este frecvent întâlnită în dizaharide (lactoza), trizaharide (rafinoză), tetrazaharide (stahioză), polizaharide (galactanii și galactoarabanii din gume, cum este guma arabică), glicozide (galactozide) și în fosfatidele din creier (sfingomieline). D-galactosa se obține alături de D-glucoză prin hidroliza lactozei.

D(-)-Fructoza, o cetoza mult răspândită în vegetale, în stare liberă sau combinată, în zaharide (zaharoza), trizaharide (gentianoză), tetrazaharide (stahioză) și polizaharide (fructozani, levani). Se prepară prin hidroliza unei polizaharide.

4.3. OLIGOZAHARIDE

Oligozaharidele sunt compuse din 2-10 resturi de monozaharide, iar polizaharidele sunt formate din mai multe monozaharide și au structură macromoleculară. Cele mai importante sunt dizaharidele, care rezultă din unirea a două molecule de monozaharide printr-o legătură glicozidică și eliminarea unei molecule de apă.

Legarea resturilor de monozaharide în oligozaharide se face prin hidroxilul glicozidic al uneia dintre ele :



Trizaharidele provin din trei molecule de monozaharide prin eliminarea a două molecule de apă.

Prin hidroliză catalitică, cu acizi sau enzime, oligozaharidele se descompun în monozaharide, care pot fi identice, ca în cazul dizaharidelor maltoză și

celobioză și din care rezultă D-glucoză sau diferite, ca în cazul zaharozei și a lactozei, din care rezultă câte o moleculă de D-glucoză și o moleculă de D-fructoză și, respectiv, o moleculă de D-glucoză și o moleculă de D-galactoză.

Într-o dizaharidă, hidroxilul glicozidic al unuia dintre resturile de monozaharidă poate fi esterificat cu hidroxilul glicozidic sau cu un hidroxil alcoolic al celuilalt rest.

Primul tip de legătură, denumită *dicarbonilică*, se întâlnește în trehaloză și în zaharoza, iar cel de al doilea tip, legătură *monocarbonilică*, se găsește la maltoză, celobioză, lactoză etc. [1].

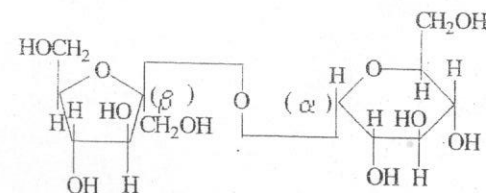
Dizaharidele cu legătură monocarbonilică conțin în moleculă un hidroxil glicozidic liber ca și în monozaharide.

Aceste dizaharide dau reacțiile tipice monozaharidelor: apar în forma a doi anomeri $\alpha \leftrightarrow \beta$, reduc soluția Fehling, trec prin oxidare într-un acid carboxilic, dau naștere la oxime, hidrazone, oxazone etc. Astfel de dizaharide se numesc *reducătoare*.

Dizaharidele cu legătură dicarbonilică, care au ambii hidroxili glicozidici blocați, nu pot da reacțiile menționate mai sus și se numesc *nereducătoare*.

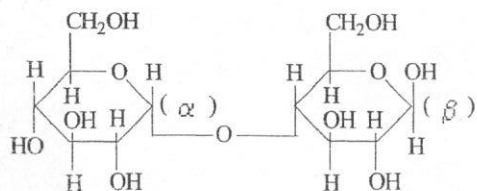
Dintre dizaharide se menționează : zaharoza, maltoza, celobioza, lactoza.

Zaharoza nu este reducătoare, prin hidroliză trece într-o moleculă de D-glucoză și o moleculă de D-fructoză. Ca în toate oligo- și polizaharidele, D-fructoza este combinată în formă furanozică.



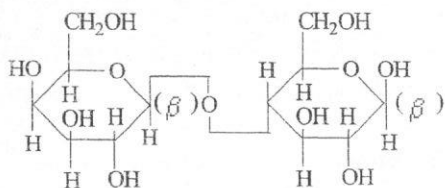
[O- β -D-fructofuranozil - (2 $\rightarrow$ 1) - α - D-glucopiranozid]

Zaharoza



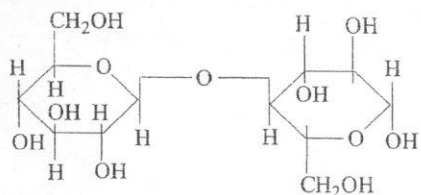
[O- α -D-glucopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranoză]

Maltoză (forma β)



Lactoză (forma β)

[O- β -D-galactopiranozil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranoză]



Celobioză (forma β)

Zaharoza este cea mai răspândită dintre toate oligozaharidele; se găsește în mai toate plantele și în cantități mai mari este în flori, în sfecla de zahăr, trestia de zahăr, în cocenii tineri de porumb.

Zaharoza este ușor solubilă în apă și greu solubilă în alcoolul etilic. În soluție apoasă este dextrogiră. Sub influența acizilor, chiar și a celor slabi, zaharoza hidrolizează la D-glucoză și D-fructoză.

Zaharoza și D-glucosa sunt slab dextrogire și D-fructoza este puternic levogiră, ceea ce face ca soluția să devină levogiră după hidroliză, de unde și numele de *inversie*, care se dă acestei hidrolize și acela de *zahăr invertit*, atribuit amestecului celor două monozaharide

Maltoza ca și celobioza și lactoza sunt dizaharide reducătoare.

Maltoza este o dizaharidă compusă din două molecule de D-glucoză, are formula unei D-glucopiranozido-4-D-glucopiranoze, posedă un hidroxil glicozidic liber și de aceea poate exista în două forme anomere ($\alpha \leftrightarrow \beta$).

Maltoza se găsește în multe plante în cantități mici. Se obține industrial prin hidroliza enzimatică a amidonului și servește ca intermediar la fabricarea berii și a alcoolului etilic. α -Glicozidaza sau *maltaza* este enzima care scindează maltoza la glucoză. Ea se găsește în drojdia de bere, în salivă, în suc pancreatic și în cel intestinal.

Lactoza este o dizaharidă reducătoare care se găsește numai în lapte, în proporție de 4-6 % și se izolează prin concentrarea zerului. Prin hidroliză cu acizi duce la D-glucoză și D-galactoză, în părți egale. Prin oxidarea lactozei se formează *acidul lactobionic*, care trece prin hidroliză în *galactoză* și *acid gluconic*.

Celobioza se poate obține din celuloză. Este un dizaharid reducător, care prin hidroliză trece în două molecule de D-glucoză de formă piranozică, ca și în maltoză. Deosebirea între celobioză și maltoză constă în natura legăturii glicozidice la atomul C1. Aceasta are în maltoză configurația α , iar în celobioză β , așa cum se vede din formulele de mai sus.

Celobioza nu este fermentată de drojdie. β -Glicozidaza din emulsină scindează celobioza în două molecule de glucoză.

Animalele superioare nu posedă o enzimă care să hidrolizeze celobioza, motiv pentru care nu poate fi folosită în alimentația acestora.

4.4. POLIZAHARIDE

Polizaharidele sunt compuși macromoleculari mult răspândiți în natură și mai ales în vegereale. Prin hidroliză, acidă sau enzimatică, polizaharidele se

transformă în monozaharide sau derivați monozaharidici simpli.

În natură se găsesc polizaharide compuse din hexoze, pentoze și derivați ai hexozelor. Unitatea monozaharidică predominantă a polizaharidelor este D-glucoza. Cele mai însemnate polizaharide care au la bază D-glucoza sunt celuloza și amidonul.

Celuloza, dintre toate substanțele organice de pe globul pământesc, se găsește în cea mai mare cantitate, urmată fiind de chitină.

În natură, se întâlnesc polizaharide compuse din hexoze: D-manoză (*mananii*), D-galactoză (*galactanii*), D-fructoză (*fructozanii*); din pentoze: D-xiloză (*xilozanii*), D-arabinoză (*arabanii*).

Pectinele conțin o polizaharidă constituită din acid galacturonic. Derivații monozaharidici care formează unitățile structurale ale polizaharidelor naturale sunt D-glucozamina, D-galactozamina, acid D-glucuronic, acidul N-acetil-muramic și acidul N-acetil-neuraminic.

Mult răspândite în natură sunt și polizaharidele compuse din două sau mai multe monozaharide diferite.

Polizaharidele numite *glicani* se deosebesc în ceea ce privește repetitivitatea unităților monozaharidice, lungimea lanțului și gradul de ramificare. Ele se clasifică în *homopolizaharide*, care conțin un singur tip de monomer (de exemplu, *amidonul* și *glicogenul* care conțin monomerul D-glucoza) și *heteropolizaharide*, care conțin două sau mai multe tipuri de monomeri (de exemplu, acidul hialuronic care conține alternativ resturi de acid D-glucuronic și N-acetil-D-glucozamină).

Polizaharidele, după funcțiile ce le îndeplinesc în plante sau animale se pot clasifica în *polizaharide de rezervă* și *polizaharide de structură*.

4.4.1. POLIZAHARIDE DE REZERVĂ

Polizaharidele de rezervă, dintre care, *amidonul* este cel mai răspândit în plante și *glicogenul* în animale, sunt obișnuit depozitate sub forma unor granule mari în citoplasma celulară. Când se produce un surplus de D-glucoză, aceasta este depozitată prin legare enzimatică la capetele lanțului de glicogen sau de amidon, iar pentru necesitățile metabolice, ea este eliberată enzimatic pentru a

fi utilizată ca sursă de energie. În rândul polizaharidelor de rezervă se menționează, de asemenea, *dextranii*, *fructanii*, *mananii* și *inulina*.

Amidonul este cea de a doua polizaharidă, după celuloză, în funcție de cantitatea și gradul de răspândire în plante de pe glob.

Ca și celuloza, amidonul este constituit din D-glucoză. Plantele își constituie rezerva de amidon în semințe, fructe și tuberculi. Amidonul este insolubil în apă, dar poate fi ușor transformat în D-glucoză sau derivații acesteia prin reacții enzimatic.

În plante, amidonul se prezintă sub formă de granule de formă și mărime specifice diferitelor specii vegetale. Diametrul granulelor este de 20–100 μ .

Amidonul este insolubil în apă rece dar solubil la temperaturi apropiate de 100°C, în funcție de proveniență, formându-se o soluție vâscoasă, care la 57–87°C se transformă într-un gel omogen.

Amidonul este un amestec de două polizaharide: *amiloza* și *amilopectina*. Separarea amilozei de amilopectină se poate realiza punând amidonul în apă la temperatura de 70°C, când granulele de amidon se umflă, fără să se spargă, iar amiloza se dizolvă și trece în soluție.

O metodă mai eficientă, constă în dizolvarea totală a amidonului în apă fierbinte și apoi adăugarea unui agent de precipitare a amilozei (n-butanol, n-pentanol, ciclohexanol, timol, acizi grași, nitroalcani). Agentul de precipitare se separă apoi cu ajutorul dizolvanților. Amidonul conține aproximativ 20% amiloză iar restul este amilopectină.

Formula brută a amidonului determinată prin analiza elementară este $(C_6H_{10}O_5)_n$, la fel ca și cea a celulozei.

Amidonul ca și celuloza sunt constituite din resturi de D-glucopiranoză, unite în pozițiile 1,4 prin legături α -glicozi-dice la amidon și β -glicozidice la celuloză. Structura amidonului este redată în Fig.4.6.

Amilopectina are o masă moleculară de 1000000–6000000. Macromoleculele de amilopectină sunt ramificate, fiind compuse din lanțuri de câte 18–26 resturi de glucoză legate între ele prin grupele lor aldehidice (Fig.4.6.a.).

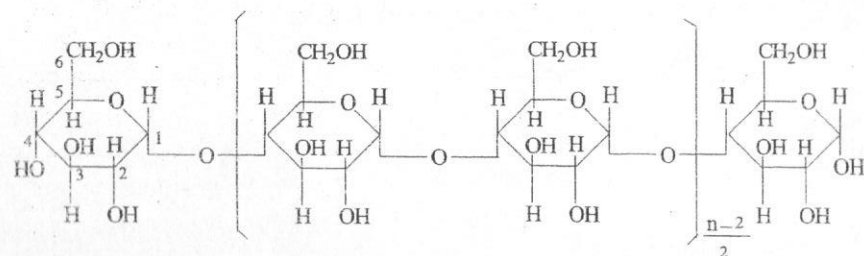


Fig.4.6. Macromolecula de amidon

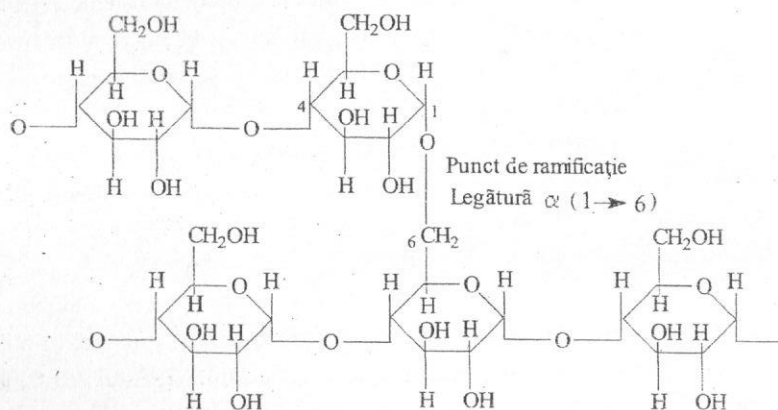


Fig.4.6.a. Fragment dintr-o macromoleculă de amilopectină

Pentru reprezentarea structurii macromoleculi de amilopectină s-au propus trei tipuri de scheme (Fig.4.7.), în care liniile drepte reprezintă catenele de 18–26 de resturi de glucoză legate între ele prin legături 1, 4- α -glicozidice iar săgețile reprezintă legături 1,6- α -glicozidice. Fiecare macromoleculă are multe grupe marginale nereducătoare și o singură grupă reducătoare R [1].

Amiloza are greutatea moleculară de 90000–200000. Macromoleculele mai scurte de amiloză, au legături numai 1,4- α -glicozidice, sunt compuse din catene perfect liniare, iar amilozele cu grade mai mari de polimerizare conțin o proporție mică de legături 1,3 - α -glicozidice.

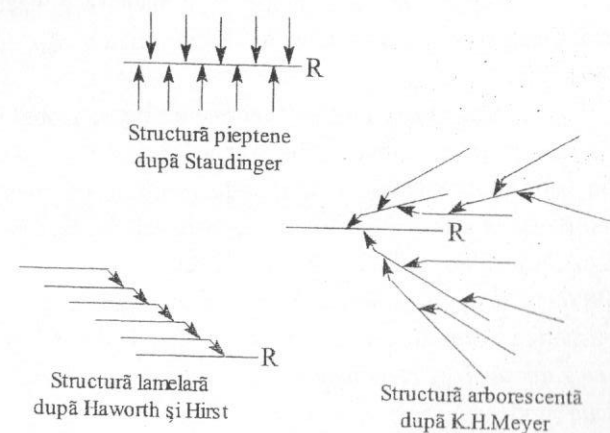


Fig.4.7. Structura macromoleculi de amilopectină

Glicogenul este principalul polizaharid de rezervă din celulele animale și este asemănător amilopectinei. Spre deosebire de amilopectină, glicogenul este ușor solubil în apă și nu formează cocă. Ca și amilopectina, glicogenul este un polizaharid format din glucoză legată $\alpha(1 \rightarrow 4)$, este mai ramificat decât amilopectina și punctele de ramificație sunt legate $\alpha(1 \rightarrow 6)$.

Glicogenul poate fi extras din țesuturile animale prin tratare cu soluție de KOH față de care legăturile $\alpha(1 \rightarrow 4)$ și $\alpha(1 \rightarrow 6)$ sunt stabile.

Glicogenul se găsește în cantitate mare în ficat (până la 10 % din greutatea umedă a ficatului) și în mușchii scheletici (în proporție de 1–2 %). Glicogenul este hidrolizat de α - și β -amilaze cu producere de glucoză și maltoză.

Dextranul este un polizaharid format din D-glucoză, dar spre deosebire de glicogen și amidon are ca legătură de bază 1,6- α -glicozidică (Fig.4.7.a.).

Dextranii se găsesc în drojdii, în bacterii și au puncte de ramificație 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4, sau 1 $\rightarrow$ 6, în funcție de specie. Formează soluții foarte vâscoase.

Fructanii sau levanii sunt homopolizaharide ce se compun din D-fructoză. Se găsesc în numeroase plante.

Inulina se găsește în anghinare și este formată din resturi de D-fructoză legate (2 $\rightarrow$ 1).

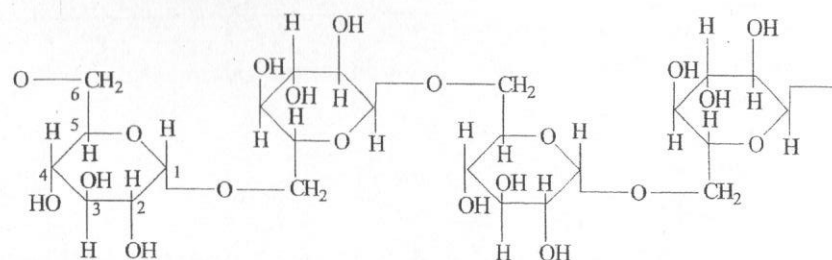


Fig.4.7.a. Legătura de bază a dextranului

Mananii sunt prezenți din nuca de fildes, lemnul coniferelor, coaja dură a multor sâmburi (coacăze, curmal), drojdii, bacterii, ciuperci și sunt compuși din resturi de manopiranoză legate prin legături β -1,4, ca și în celuloză.

4.4.2. POLIZAHARIDE DE STRUCTURĂ

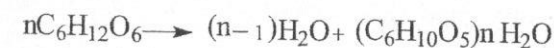
Multe polizaharide servesc, mai ales, ca elemente de structură ale pereților celulari, a învelișurilor celulare, ale spațiului intracelular, cărora le conferă forma, elasticitatea sau rigiditatea țesuturilor vegetale. Astfel, cel mai important polizaharid de structură, din punct de vedere cantitativ și grad de răspândire, este *celuloza* (vezi capitolul 2.4.8. din volumul I). Unele polizaharide sunt componente majore ale formațiilor scheletice exterioare ale unor nevertebrate, așa cum este *chitina* (vezi capitolul 2.4.9.1. din volumul I).

Celuloza este materialul din care sunt construiți pereții celulelor vegetale și adesea se găsește în plante sub formă de fibre. În plante celuloza este frecvent amestecată cu cantități variabile de alte polizaharide, lignină, grăsimi, rășini și substanțe minerale. Îndepărtarea acestor substanțe străine nu este posibilă fără modificarea, mai mult sau mai puțin pronunțată, a celulozei.

Celuloza cea mai pură se găsește în fibrele vegetale textile (perii semințelor de bumbac, fibrele din tulpina de ramie, fibrele de in).

Celuloza, prin tratare cu acid clorhidric suprasaturat, se desface aproape cantitativ în D-glucoză.

Celuloza este un compus macromolecular, nu se topește la încălzire ci se descompune, iar soluțiile sale au caracter coloidal. Se poate admite că prin combinarea mai multor molecule de glucoză, cu eliminare de apă, se ajunge la formula celulozei :



Deoarece gradul de polymerizare (n) este mare, molecula de apă, din formula de mai sus, nu poate fi decelatată prin analiza elementară, așa că formula este destul de exact redată prin: $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Toate resturile de glucoză din macromolecula de celuloză sunt unite între ele în pozițiile C1 și C4, prin legături β -glicozidice (Fig.4.8.).

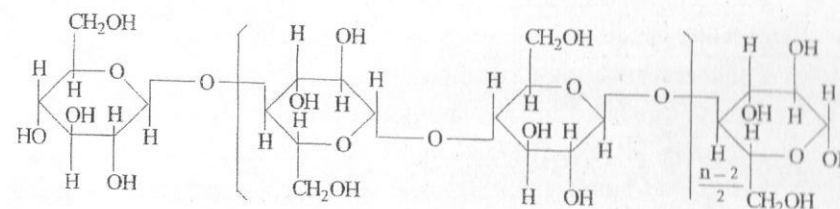


Fig.4.8. Macromolecula de celuloză

Macromoleculele de celuloză, de diferite proveniențe, au o masă moleculară dată, din diferite surse, de 50000 la 2500000, iar gradul de polymerizare de 300 la 15000. Celulozele cu grade de polymerizare diferite se deosebesc prin anumite proprietăți fizice (rezistența mecanică, îmbibarea cu dizolvanți și solubilitatea).

Celuloza este formată din mănunchiuri de lanțuri paralele formând fibre. Celuloza nu are punct de topire. Încălzită la presiune redusă, în anumite condiții, suferă o depolimerizare trecând în glucozan.

Celuloza este complet insolubilă în apă, insolubilitate determinată de numărul mare de legături de hidrogen dintre macromolecule. În apă, are loc doar o îmbibare limitată sau o umflare în cursul căreia moleculele de apă înconjură macromoleculele de celuloză, dar ele nu trec în soluție.

Fibrele de celuloză păstrate în aer de umiditate normală, absorb 7-8% apă, în aerul saturat cu vapori de apă absorb 22-24% apă. Celuloza este, deci, higroscopică. La îmbibarea cu apă, fibrele de celuloză cresc puțin în diametru, iar lungimea lor rămâne neschimbată.

Soluțiile de hidroxid de sodiu produc o îmbibare a celulozei mult mai puternică decât în apă. Cu o soluție concentrată de hidroxid de sodiu se produce *alcaliceluloza*, iar celuloza sodată are compoziția de un mol de celuloză la un mol de NaOH. Cu apa în exces, celuloza sodată suferă hidroliză regenerând celuloza. Celulozele degradate, cu grad de polimerizare sub 300 se dizolvă, la rece, în soluție de 2,5 N NaOH.

Oxichelulozele sunt acelea care au suferit alterări prin oxidare, mai ales în prezența bazelor, de exemplu, albirea celulozei cu hipocloriți.

Celuloza nu este atacată de α -sau β -amilaze.

Enzima care hidrolizează celuloza este *celulaza*. Aceasta nu se găsește în sucii digestivi ai majorității mamiferelor și de aceea ele nu pot utiliza celuloza ca sursă de hrană. Rumegătoarele fac excepție, deoarece bacteriile din rumenul lor secretă celulază, care hidrolizează celuloza la D-glucoză.

Chitina are structură polizaharidică și este o componentă importantă a formațiilor scheletice exterioare ale unor nevertebrate (insecte, crustacee, viermi, moluște).

Chitina este un polizaharid care conține azot, deoarece este un homopolimer format din N-acetil-D-glucozamină, legată β (1 $\rightarrow$ 4).

Structura sa este asemănătoare cu cea a celulozei de care se deosebește prin faptul că grupa OH din poziția 2 a celulozei este înlocuită cu restul NHCOCH_3 .

Această structură explică rezistența mecanică mare a chitinei (Fig. 4.9.).

Prin hidroliză cu *chitinază*, enzimă din tubul digestiv al melcului, se formează N-acetil-glucozamină. La 6-7 resturi de N-acetil-D-glucozamină se găsește un rest neacilat.

Chitina fiind un poliacetal, este cu ușurință hidrolizată de acizi, dar este stabilă la acțiunea soluțiilor alcaline diluate. La temperaturi de 50-60°C chi-

tina se denaturează în timp, iar în mediu puternic alcalin este oxidată de oxigenul din aer.

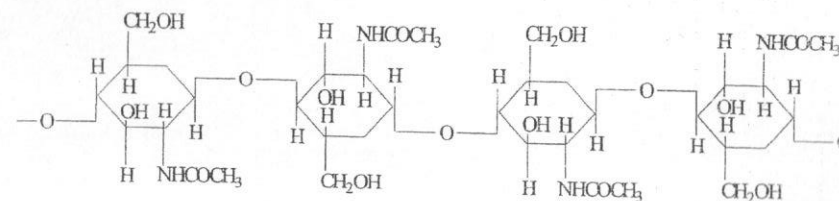
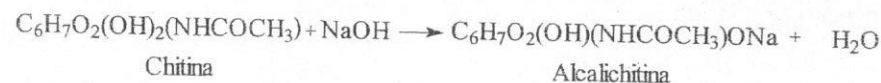
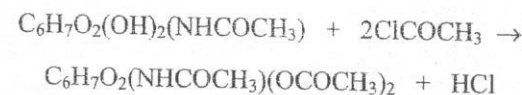
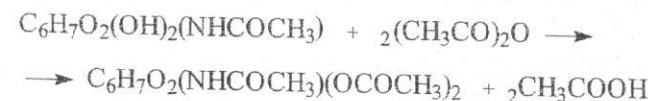


Fig.4.9. Macromolecula de chitină

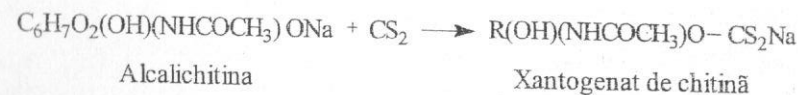
Chitina este un compus macromolecular filmogen, la fel ca și derivații săi. Poate forma amestecuri omogene cu alți polimeri naturali și sintetici. Ca și celuloza este deosebit de reactivă. În mediu de hidroxid de sodiu formează alcalichitina:



Chitina se poate acetila cu anhidrida acetică, clorura de acetil și cu acidul acetic:



Alcalichitina se combină cu sulfura de carbon și formează xantogenatul de chitină:



Se pot obține eteri de chitină prin O-alchilare cu halogenuri alchilice sau cu alchilsulfați în prezența alcaliilor. Proprietățile eterilor de chitină depind de radicalul introdus la O-alchilare și de gradul de substituție.

Glicoproteine.

Glicoproteinele sunt un grup mare de proteine conjugate, cu importanță biologică deosebită, care conțin resturi de hidrați de carbon legate covalent de lanțuri polipeptidice, cum sunt unii hormoni (*gonadotropina corionică*, *hormonul stimulator al foliculinei*, *hormonul stimulator al tiroidei*), unele enzime (*pepsina*, β -glucuronidaza, *ribonucleaza B*), *ovalbumina*, *avidina* și *ovomucoidul* din albușul de ou, *glicoproteinele învelișului celular*, *glicoproteinele din sânge*, *mucoproteinele din secrețiile mucoaselor*, *glicoproteinele din membranele fundamentale extracelulare*.

4.5. GLICOPROTEIDE

Glicoproteidele conțin resturi de hidrați de carbon legate covalent de lanțul polipeptidic și reprezintă un grup mare de compuși cu o deosebită semnificație biologică.

Dintre glicoproteidele, mai importante, prezente în celule și mai ales extracelular, se menționează: în membranele celulare (*glicoforina eritrocitelor membranare*), în membranele extracelulare (*glicoproteida din membrana bazală*), în *colagen*, în plasmă (*imunoglobuline*, *fibrinogen*, *acidul α_1 -glicoproteic*, *fetuina*, *proteinele de grup sanguin*), în secreții ale mucoaselor (*glicoproteidele gastrice*, *glicoproteidele submaxilare*), în albușul de ou (*ovalbumina*, *ovomucoida*, *avidina*), unele enzime (*pepsina*, β -glucuronidaza, *ribonucleaza B*), unii hormoni (*hormonul stimulator al foliculinei*, *hormonul stimulator al tiroidei*, *gonadotropina corionică*).

Procentul cantitativ al hidraților de carbon în glicoproteide variază de la cel puțin 1% până la 80%.

O cantitate însemnată de hidrați de carbon se găsește în glicoproteidele cunoscute sub numele de *mucoproteide* sau *mucoide* sau *mucine*. Glicoproteidele cu un conținut ridicat de hidrați de carbon poartă numele de *proteoglicani*.

Mucoproteidele se împart în solubile, insolubile și acide. Dintre mucoidele solubile se menționează: *mucoida din salivă*, din ou (*ovomucoida*), din *bacilul antrax* și *gonadotropina corionică*. Dintre mucoidele insolubile fac parte: *ovomucoida β* , *proteida reziduală* din umoarea sticloasă și *capsula cristalinului* și *omucoidă acidă* care este secretată de glanda submaxilară.

Hidrații de carbon din glicoproteide sunt polizaharide care conțin întotdeauna resturi de N-acetil-hexozamină, alături de resturile altor monozaharide sau acizi uronici [1].

Mucoproteidele sunt substanțe gelatinoase; unele contribuie la lubrefiere, altele au rol de ciment flexibil intracelular. La mucoproteide, partea proteică ocupă, în majoritatea cazurilor, o poziție centrală, de tipul unui miez al macromoleculei, iar polizaharidele se găsesc la exterior, ca lanțuri laterale lungi (Fig.4.10.).

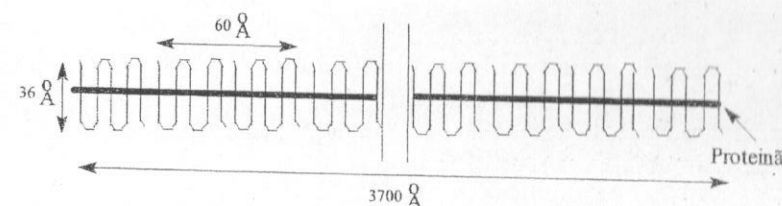


Fig.4.10. Reprezentarea schematică a complexului proteină-mucopolizaharidă.

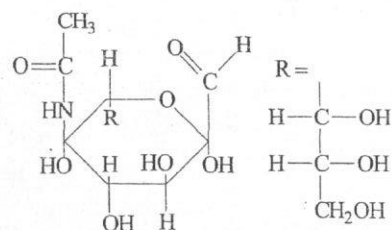
Lanțurile laterale, liniare sau ramificate, pot conține de la două până la zeci de resturi monozaharidice. Cel mai adesea, monozaharidul terminal este un rest încărcat negativ al *acidului N-acetil neuraminic* (acidul sialic).

Majoritatea mucopolizaharidelor din organism sunt legate de proteine formând *proteoglicani*.

Proteoglicanii sunt o clasă aparte de glicoproteine care au fost glicozilate.

Ei constau, așa cum s-a spus mai sus, dintr-un miez proteic și unul sau mai multe lanțuri de glicozaminoglicani care sunt atașate covalent.

Glicozaminoglicanii au lanțuri lungi, polimeri carbohidrați liniari, care sunt încărcati negativ sub condițiile fiziologice (Fig.4.11.).



Acid N-acetilneuraminic
(acid sialic)

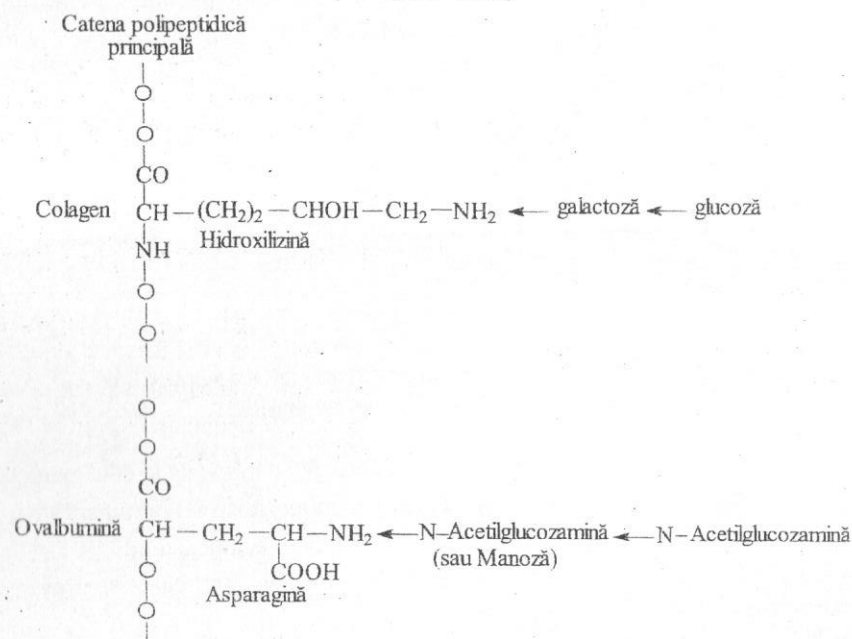


Fig.4.11. Catene laterale oligozaharidice a glicoproteidelor
colagen și ovalbumină

Un proteoglican este o combinație a unei proteine și a unui glicozaminoglican. Asocierea între cele două tipuri de lanțuri se efectuează în aparatul Golgi, dar în mod egal la nivelul reticulului endoplasmatic a unei celule. Proporția

glucidelor proteoglicanilor poate ajunge la 95 %. Aceasta se prezintă sub forma unuia sau mai multor lanțuri de glicozaminoglicani neramificați.

Proteoglicanii se pot clasifica în funcție de natura lanțurilor de glicozaminoglicanii pe care îi conțin.

Aceste lanțuri pot fi: condroitin sulfat sau dermatan sulfat; heparin sau heparan sulfat; keratan sulfat etc.

Proteoglicanii pot fi, de asemenea, grupați după mărimea lor:

– Proteoglicani mari cum sunt: *aggrecan*, principalul proteoglican din cartilaj și *versican* prezent în multe țesuturi adulte care includ vasele de sânge și pielea. Aggrecanul este glicozilat cu condroitin sulfat. Versicanul este, de asemenea, glicozilat cu condroitin sulfat și face parte din aceeași familie de proteoglicani cu *Aggrecan*, *Neurocan*, *Lectican*.

– Proteoglicani mici bogați în leucină cum sunt: *fibromodulin*, *lumican*, *decorin* și *biglican*. Fiecare din acești proteoglicani au câte 10–12 leucine, tandem care se repetă și care completează porțiunea centrală, miezul proteic. Fibromodulin, ca și lumican conțin sulfatul de keratan.

Fibromodulinul se găsește de-a lungul fibrelor cartilajului articular împreună cu multe țesuturi conjunctive.

Decorinul este glicozilat cu un singur lanț de condroitin sulfat sau keratan sulfat.

Biglicanul este asemănător cu decorinul, dar este glicozilat cu două lanțuri de condroitin sulfat sau de keratan sulfat.

Proteoglicanii sunt componenți importanți ai matrixului extracelular animal. Aici ei formează complecși mari cu alți proteoglicani și cu matrixul fibros proteic, asemenea collagenului. Ei sunt implicați în legarea cationilor (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), a apei și de asemenea, reglează mișcarea moleculelor în matrice.

4.5.1. MUCOPOLIZAHARIDE

Denumirea de mucopolizaharide a fost dată de Meyer pentru a indica polizaharidele cu greutate moleculară mare, care conțin hexozamine. Ele reprezintă cel mai abundent material extracelular de natură heteropolizaharidică. Mucopolizaharidele conferă tărie și flexibilitate țesuturilor conjunctive animale.

Mucopolizaharidele sunt un grup de substanțe care conțin două tipuri de unități monozaharidice alternative, din care una sau ambele conțin grupări acide.

Distribuția spațială a grupelor anionice și gradul lor de ionizare vor contribui la conformația moleculei datorită respingerii electrostatice reciproce a sarcinilor negative de-a lungul catenei principale polizaharidice. În plus, atât conformația unei molecule simple, cât și structura terțiară a mucopolizaharidelor în soluții concentrate, geluri și în stare solidă, vor fi influențate de numărul mare de legături de hidrogen inter- și intramoleculare dintre grupele polare abundente și de interacțiunile hidrofobe ale părții proteice.

Mucopolizaharidele cele mai importante cantitativ și fiziologic sunt: *acidul hialuronic*, *condroitin 4 și 6 sulfat*, *heparina*, *sulfatul de heparină*, *sulfatul de dermatan* și *sulfatul de keratan*.

4.5.1.1. ACIDUL HIALURONIC

Acidul hialuronic este unul dintre cele mai importante mucopolizaharide ale țesutului conjunctiv. A fost izolat pentru prima dată de Meyer și Palmer din umoarea vitroasă din ochiul de bovină. Este foarte răspândit în diferite țesuturi conjunctive fiind prezent în învelișul celular, în lichidele sinovial și vitros ale animalelor și în unele bacterii. Meyer a demonstrat că acidul hialuronic este format din cantități echimoleculare de acid glucuronic și 2-acetamido-2-deoxi-D-glucoză (Fig.4.12.).

Prin repetarea unității dizaharidice ia naștere lanțul polimeric a acidului hialuronic, în care, partea de glucozamină este legată prin legătură β -glicozidică în poziția C-3 a acidului glucuronic [2-acetamido-2-deoxi-3-O- (β -D-glucopiranozil acid uronic)-D-glucoză].

Polimerul se realizează prin legătura 1 $\rightarrow$ 4 β -glicozidică a grupei care se repetă a acidului hialuronic.

Acidul hialuronic este un biopolimer liniar, conține grupări carboxil complet ionizate la pH=7. Este solubil în apă formând soluții foarte vâscoase. Unitatea repetabilă a acidului hialuronic este un segment de lanț foarte rigid, cu o lungime de 11,98Å.

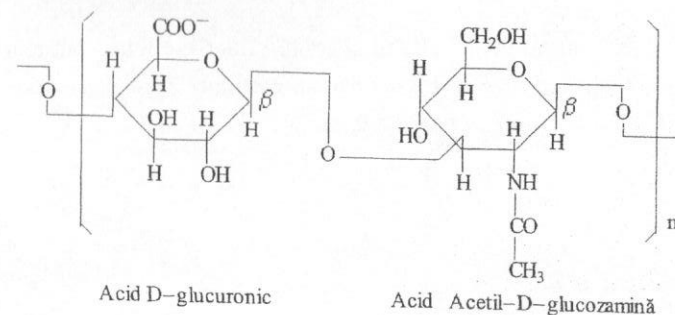


Fig.4.12. Structura unității repetabile a acidului hialuronic

Gradul de polimerizare a acidului hialuronic variază după tipul de țesut conjunctiv în care se găsește și condițiile fiziologice locale. Greutatea sa moleculară este de $2-5 \times 10^5$ în umoarea vitroasă, de $1-10 \times 10^6$ în cordonul ombilical, de $3,5-6 \times 10^4$ în peretele aortei.

Acidul hialuronic cu greutate moleculară mică are molecula sub formă de bastonaș cu o lungime de 250-1000Å. Moleculele mai mari au formă de spirală dezordonată, cu raza de girație de 540-4540Å.

Enzima *hialuronidaza* catalizează hidroliza legăturii $\beta(1 \rightarrow 4)$ a acidului hialuronic.

Acidul hialuronic poate asocia și transfera o mare cantitate de apă.

4.5.1.2. CONDROITINA, CONDROITIN-4-SULFAT, CONDROITIN-6-SULFAT

Sub aspect structural, *condroitin mucopolizaharida* este strâns înrudită cu acidul hialuronic. Se aseamănă cu acidul hialuronic la structura primară, cu excepția că fragmentul hexozamina este o galactozamină în loc de o glucozamină.

Această mucopolizaharidă a fost izolată de Meyer din corneea de bovină și este un biopolimer (1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D acid glucopiranoziluronic-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxi- β -D-galactopiranoză.

Condroitina este un component minor al materialului extracelular, în

Schimb, condroitin-4-sulfatul și condroitin-6-sulfatul sunt componente structurale majore a învelișului celular, în cartilaje, schelet, cornee și alte structuri ale țesutului conjunctiv al vertebratelor.

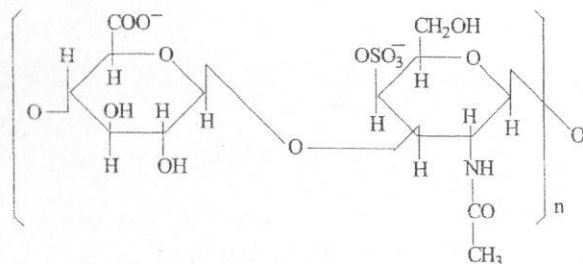


Fig.4.13. Structura unității repetabile din condroitin-4-sulfatul

Frecvent, polizaharidele acide ale țesutului conjunctiv sunt condroitin-4-sulfatul (sau condroitin sulfatul A) și condroitin-6-sulfatul (sau condroitin Sulfatul C). Condroitinul se apreciază că ar fi precursorul biologic al sulfatilor de condroitin A și C.

Condroitin-4-sulfatul (A) s-a izolat pentru prima dată din cartilaje. Unitatea repetabilă din lanțul polimerului este o dizaharidă, *condrozina*, în care acidul glucuronic este legat printr-o legătură 1→3-β de fragmentul galactozamină, iar galactozamina este sulfată în poziția C4 (Fig.4.13.).

Condroitin-6-sulfatul (C) a fost izolat pentru prima dată de Meyer și Palmer din cordonul ombilical.

Singura diferență între condroitin-4-sulfatul și condroitin-6-sulfatul este poziția sulfatului de pe fragmentul galactozamină. În primul caz el se găsește în poziția C4 și în cel de al doilea, în poziția C6 (vezi capitolul 2.4.2.4. din volumul I).

4.5.1.3. SULFATUL DE DERMATAN

Sulfatul de dermatan sau *sulfatul de condroitin B* sau *β-heparina* s-a izolat pentru prima dată din pielea de porc.

Unitatea repetabilă a sulfatului de dermatan este : (1→4)-O-α-L-acid idopiranoziluronic-(1→3)-2-acetamido-2-deoxi-4-O-sulfo-β-D-galactopiranoză (Fig. 4.14.). Totuși, sunt dovezi că sulfatul de dermatan este compus numai din resturi iduronice și N-acetil-galactozaminice.

Sulfatul de dermatan se găsește în piele, cornee și țesutul osos.

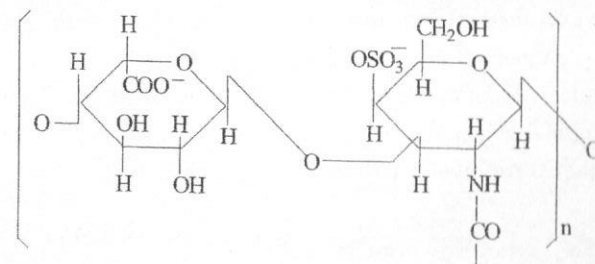


Fig.4.14. Structura unității repetabile din sulfatul de dermatan

4.5.1.4. HEPARINA, SULFATUL DE HEPARINĂ

Heparina este o polizaharidă acidă, puternic sulfată și a fost izolată de McLean din ficat. Ea se găsește, de asemenea, în piele, mușchi, plămâni, inimă, rinichi și în sânge. Ea previne coagularea sângelui.

Unitatea repetabilă a heparinei este formată din cantități echimoleculare de resturi de D-glucozamină și de acid D-glucuronic (Fig. 4.15.).

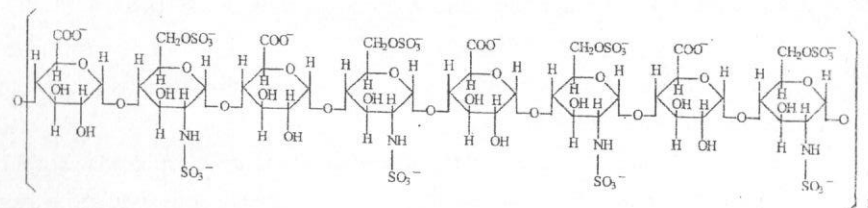


Fig. 4.15. Structura unității repetabile a lanțului de heparină

Sulfatul de heparină este o mucopolizaharidă dextrogiră ce conține canti-

tăți echimoleculare de resturi de glucozamină, acid uronic, acetyl și sulfat (Fig.4.16.).

Pe baza compoziției sale, s-a sugerat că unitatea care se repetă poate să fie o tetrazaharidă, o grupă N-acetyl, una N-sulfat și o grupă O-sulfat. În consecință, sulfatul de heparină poate să fie un copolimer al dizaharidelor în care fragmentul de glucozamină are O-sulfați și un fragment de dizaharide care au N-acetilglucozamină.

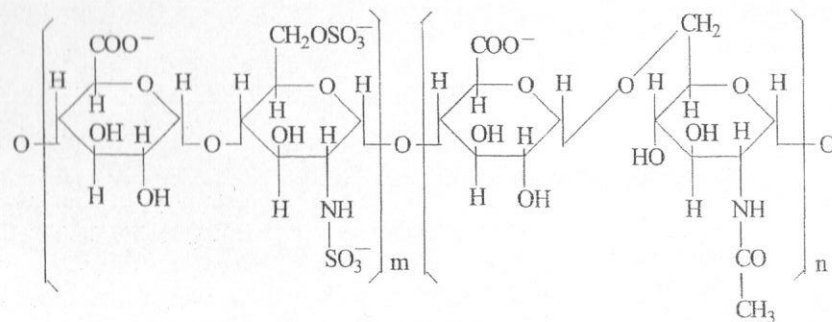


Fig.4.16. Structura unității repetabile din sulfatul de heparină

4.5.1.5. SULFATUL DE KERATAN

Sulfatul de keratan a fost semnalat în cornea de bovine, unde reprezintă aproape jumătate din totalul mucopolizaharidelor prezente.

Unitatea care se repetă este N-acetilactozamina sulfată în C-6 al fragmentului de glucozamină. Este polimerizată la legătura 1→3 glicozidică (Fig. 4.17.)

4.5.1.6. HIDRATAREA MUCOPOLIZAHARIDELOR

Mucopolizaharidele din țesuturi se găsesc în diferite stadii de hidratare și formează geluri sau soluții concentrate. În matricea tisulară, mucopolizaharidele sunt răspunzătoare de imbibarea și retenția de apă.

La hidratare au importanță următorii factori:

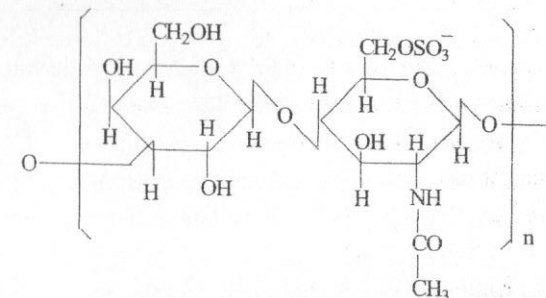


Fig.4.17. Structura unității repetabile din sulfatul de keratină

- capacitatea de sorbție a apei;
- capacitatea de retenție a mucopolizaharidelor;
- energia procesului de sorbție.

Capacitatea de sorbție a apei se definește prin cantitatea de apă de hidratare a unui eșantion solid de mucopolizaharidă la o anumită presiune de vapori.

Capacitatea de sorbție a apei este caracterizată de izoterma de sorbție, care reprezintă cantitatea de apă de hidratare, în grame sau moli de apă pe gram sau unitate de polimer la o anumită temperatură (Fig.4.18).

Majoritatea izotermelor mucopolizaharidelor pentru sorbția vaporilor de apă au o formă generală de S.

Izoterma sorbției poate fi analizată cu ecuația Brunauer, Emmett și Teller:

$$\frac{P/P_0}{a(1 - P/P_0)} = \frac{1}{Am C} + \frac{(C - 1) P/P_0}{Am C}$$

unde:

- P/P_0 = presiunea relativă a vaporilor;
- a = cantitatea de apă absorbită la fiecare presiune relativă de vapori;
- Am = cantitatea de apă absorbită la formarea stratului molecular;
- C = un termen care este egal cu căldura netă de sorbție.

Din fig.4.18. rezultă că procesele de hidratare și deshidratare nu urmează aceeași cale, iar deosebirea este raportată ca fiind histereza. Bucla histerezei este măsura gradului de ireversibilitate a procesului.

La început matricea solidă este hidratată la grupele polare disponibile, care sunt cele mai energice din punctul de vedere al interacțiunilor (dipol-dipol sau ion-dipol).

Se formează un strat monomolecular de apă, care poate fi evaluat prin trăsarea graficului $[P/P_0] / a[1 - P/P_0]$ față de P/P_0 .

Până la presiunea relativă a vaporilor de circa 0,3–0,5 at se obține o dreaptă. După ce stratul monomolecular de apă se completează izoterm, apare o creștere gradată concomitent cu creșterea presiunii de vapor.

Stratul monomolecular de apă de la grupele polare este capabil să rețină alte molecule de apă. În cazul polimerilor este un proces de umflare.

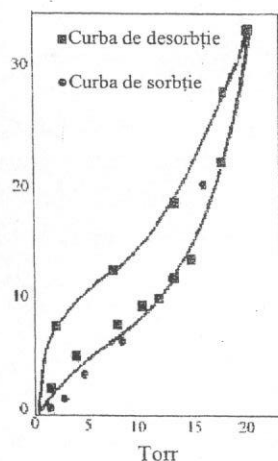


Fig.4.18. Izoterma și histerezisul de sorbție a hialuronatului de sodiu semicristalin la temperatura de 24°C

Se remarcă apoi o tendință de creștere accentuată a izotermei de sorbție; are loc sorbția unei cantități mai mari de apă la o modificare mică a presiunii vaporilor. Acest proces este asociat cu condensarea capilară a apei în micropori matricei solide, iar în cazul umflării, are loc un proces de dizolvare.

Acidul hialuronic are un volum hidrodinamic mare, care este estimat la 200–500 ml/g. Grupele polare ale mucopolizaharidelor responsabile în procesul de hidratare au importanță în următoarea ordine descrescătoare: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_2$.

Bibliografie selectivă

1. Nenitescu C.D., *Chimie Organică*, vi. I și II, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980
2. Lehninger A.L. *Biochimie*, vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1987, 1992
3. Chiriță Gh., Chiriță M., *Chimia pielii*, Ed. I.P.I., 1987
4. Elden R.H., *Biophysical Properties of the Skin*, vol. I, Wiley – Interscience, Inc. New York, London, Sydney, Toronto, 2010
5. Tomasik P., *Chemical and Function Properties of Food Saccharides*, CRC Press, USA, 2013
6. Rosenberg A., *Biological roles of sialic acid*, Plenum Press, N.York, 2006
7. Gottschalk A., *Glycoproteins: Composition, Structure and Function*, ed. II, vol. II, Elsevier, Amsterdam, 1972
8. Pigman W.W., Horton D., *The Carbohydrates*, vol. IA and IB, Academic Press, New York, 1972
9. Lindhorst K.T., *Struktur und Funktion von Kohlenhydraten*, Chemie in unserer Zeit, 34, 1, 2010
10. Lehmann J., *Kohlenhydrate. Chemie und Biologie*. Thieme, Stuttgart, New York, 1996, 2001
11. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M., (eds), *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York, 1993
12. Martin A., Rambal C., Berger V., Perier S., *Biochimie*, 80 1998
13. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu – Gheorghiu M., *Biochimie Medicală*, Editura Medicală, București, 1980

14. Jurcoane Ș., Cornea P., Stoica I., Vassu T., *Tratat de Biotehnologie*, vol. I, Editura Tehnică, București, 2004
15. Felszeghy E., Abrahám A., *Biochimie*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1972
16. Gyorgydeak Z., Pelyvas I.F., *Monosaccharide Sugars*, Academic Press, 1998
17. Stick R., Williams S.J., *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*, 2nd Edition, Elsevier Science, 2008
18. Ed. Bacic A., Fincher G.B., *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, Academic Press, 2009
19. Ed. H.G.Garg, M.K. Cowman, C.A. Hales, *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*, Elsevier Science, 2008
20. Teocharis A.D., Neil. T., Skandalis S.S., *Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine*, BBA - Reviews on Cancer, 2015
21. Schaefer L., Tredup C. Iozzo R.V., *Proteoglycan neofunctions: Regulation of inflammation and autophagy in cancer biology*, FEBS J., 2016
22. Li J.P., Kusche-Gullberg M., *Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function*, International Review of Cell and Molecular Biology, Vol. 325, 2016

CAPITOLUL 5

5. LIPIDE

5.1. Introducere	520
5.2. Lipidele complexe	520
5.2.1. Gliceridele	520
5.2.1.1. Proprietățile fizice și chimice ale gliceridelor	522
5.2.2. Acizii grași	525
5.2.3. Alchileteracilglicerolii	528
5.2.4. Glicozilacilglicerolii	528
5.2.5. Fosfogliceridele	529
5.2.6. Sfingolipidele	531
5.2.6.1. Sfingomielinele	533
5.2.6.2. Glicosfingolipidele neutre	533
5.2.6.3. Glicosfingolipidele acide	534
5.2.7. Cerurile	535
5.3. Lipidele simple	536
5.3.1. Terpenele	536
5.3.2. Steroidele	538
5.3.3. Prostaglandinele	543
<i>Bibliografie</i>	544

5.1. INTRODUCERE

Lipidele sunt biomolecule insolubile în apă și se pot extrage din celule și țesuturi cu ajutorul solvenților organici nepolari (eterul de petrol, eterul etilic, benzenul, cloroformul etc.).

Lipidele au o serie de funcții biologice: fac parte din structura membranelor celulare, sunt componente ale suprafeței celulare, au rol de înveliș protector al suprafeței multor organisme.

Substanțe din clasa lipidelor, cum sunt unele vitamine și hormoni etc., au importante activități biologice, asigură rezerva de energie predominant în formă de trigliceride, acizii lipofilici ai bilei ajută la solubilizarea lipidelor etc.

Lipidele se află uneori combinate covalent, sau prin legături slabe, cu alte clase de biomolecule formând molecule hibride: glicolipide, lipoproteine.

Lipidele se pot grupa în *lipide simple* (*terpene*, *steroizi*, *prostaglandine*), care nu conțin acizi grași și nu sunt saponificabile, prin hidroliză alcalină nu formează săpunuri și *lipide complexe*, care sunt saponificabile, se caracterizează prin prezența în structura lor a acizilor grași; ele cuprind *gliceride*, *fosfogliceride*, *sfigolipide* și *ceruri* și se deosebesc între ele prin natura catenei de care sunt legați covalent acizii grași.

5.2. LIPIDELE COMPLEXE

5.2.1. GLICERIDELE

Gliceridele (acilglicerolii sau materiile grase) reprezintă o clasă de substanțe deosebit de importantă pentru animale și plante.

Acilglicerolii se găsesc în toate țesuturile și lichidele organismului animalelor, sunt componente structurale, reprezintă o rezervă de hrană și energie și sunt dizolvanți ai vitaminelor liposolubile.

Materiile grase vegetale și animale se găsesc în cantități mari și se obțin din următoarele surse:

- Materiile grase vegetale se găsesc în semințe (în, cânepă, soia, mac, bumbac, floarea soarelui, ricin, struguri, tomate), fructe (măslin, palmier, fag),

tuberculi (arahide), germeni (porumb);

- Materiile grase la animalele terestre se găsesc sub formă de seuri (bovine, ovine, caprine), unturi (porc, pasăre), grăsimi din lapte (vacă, oaie, capră), la animalele marine și pești: uleiuri de pești, ulei de ficat de morun, grăsime de focă, morskă, balenă.

Acilglicerolii sunt esteri ai glicerolului cu acizii grași. Când toate cele trei grupe hidroxilice ale glicerolului sunt esterificate cu acizi grași rezultă triacilglicerolul.

Triacilglicerolii reprezintă clasa cea mai numeroasă de lipide și reprezintă componentele cele mai importante cantitativ ale lipidelor de depozit din celulele vegetale și animale.

Triacilglicerolii solizi la temperatura ambiantă sunt denumiți grăsimi, iar cei lichizi, uleiuri. Diacilglicerolii (digliceride) și monoacilglicerolii (monogliceride) se găsesc în stare naturală, dar în cantități mult mai mici (Fig.5.1).

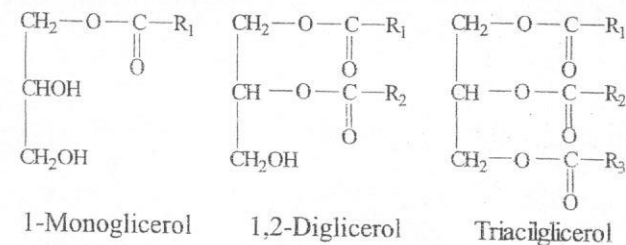


Fig.5.1. Mono-, di- și trigliceroli

Triacilglicerolii, care au un singur tip de acid gras în toate cele trei poziții în care se poate face esterificarea, se numesc *triacilgliceroli simpli* (tripalmitoilglicerol, sau tripalmitină, trioleoilglicerol sau trioleină etc.). *Triacilglicerolii micști* conțin doi sau trei acizi grași diferiți (exemple, 1-palmitoildesteailglicerol sau 1-palmitodistearină).

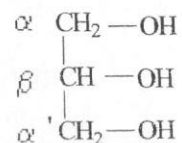
Grăsimile naturale sunt, de obicei, amestecuri complexe de triacilgliceroli simpli și micști, la care pot participa acizi grași saturați și nesaturați.

Proprietățile gliceridelor (acilglicerolilor) depind de natura acizilor grași și

de proporția în care ei sunt conținuți în glicerida respectivă.

Acidul gras dominant influențează semnificativ proprietățile fizico-chimice ale gliceridei. Proprietățile gliceridelor depind și de felul cum sunt poziționați acizii grași în moleculă.

Glicerolul are două funcții alcoolice primare (α , α') și o funcție alcoolică secundară (β):



Cercetările întreprinse de Savary P. și Mattson F. asupra structurii gliceridelor prin hidroliză cu lipază, au dus la următoarele concluzii:

- unii acizi grași ocupă în unele uleiuri și grăsimi poziții bine determinate;
- la majoritatea materiilor grase naturale, acizii grași saturați se leagă, în special, la funcțiile alcoolice primare ale glicerolului, în pozițiile α și α' , iar acizii grași nesaturați se leagă cu predilecție la funcția alcoolică secundară β .

O particularitate, față de cele afirmate mai sus, o prezintă grăsimea de porc la care gliceridele au legate acizi grași nesaturați, cu predilecție, la funcțiile alcoolice primare, în pozițiile α și α' , iar poziția internă β este ocupată de acizii grași saturați.

Monoacilglicerolii și diacilglicerolii se utilizează în industria alimentară, deoarece sunt digestibili și utilizabili biologic. Acilglicerolii, sub acțiunea acizilor, bazelor, a lipazelor hidrolizează la acizi grași și glicerol.

5.2.1.1. PROPRIETĂȚILE FIZICE ȘI CHIMICE ALE GLICERIDELOR

Proprietățile fizice ale gliceridelor depind de natura acizilor grași participanți în structură, de masa lor moleculară, de gradul de nesaturare, de natura și cantitatea substanțelor însoțitoare.

Aciditatea liberă a unei gliceride este caracterizată prin *indicele de acidita-*

te, care este cantitatea de KOH în mg necesară a neutraliza, la rece, un gram de materie grasă.

După consistența lor, gliceridele (materiile grase) sunt solide, semisolide sau lichide la temperatura camerei, grupându-se în:

- uleiuri, care sunt lichide până la temperatura de -15°C ;
- grăsimi și unturi, care se topesc la $20^{\circ}-30^{\circ}\text{C}$;
- seuri, care se topesc peste 35°C .

În general, uleiurile provin din plante, dar sunt și uleiuri de pește, de ficat de morun, și de la unele animale marine; grăsimile, unturile și seurile se găsesc în organismele animalelor, iar untul de cacao se obține din fructele arborelui de cacao.

Prin încălzire, materiile grase solide se topesc, de obicei, până la temperatura de 50°C , iar peste 250°C încep să se descompună.

Greutatea specifică a gliceridelor este de $0,910-0,970 \text{ g/cm}^3$. La același număr de atomi de carbon în moleculă, acizii grași nesaturați au o greutate specifică mai mare decât a acelor saturați.

Gliceridele sunt insolubile în apă și solubile în solvenți organici: eter etilic, benzină, benzen, sulfură de carbon, toluien, acetonă, hidrocarburi clorurate. Toate gliceridele sunt insolubile în alcool etilic, cu excepția uleiului de ricin, care conține o grupă hidroxil.

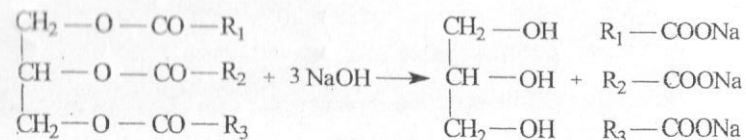
Acizii grași se solvă în aceiași solvenți organici, dar și în alcool etilic. Solubilitatea lor este cu atât mai mare cu cât au masa moleculară mai mică și cu cât sunt mai saturați.

Punctul de topire al trietilglicerolilor este determinat de natura acizilor grași saturați din compoziția lor.

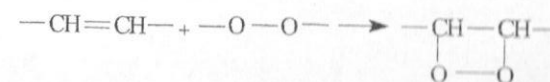
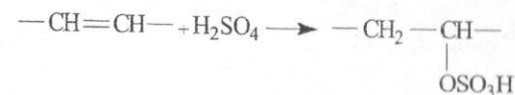
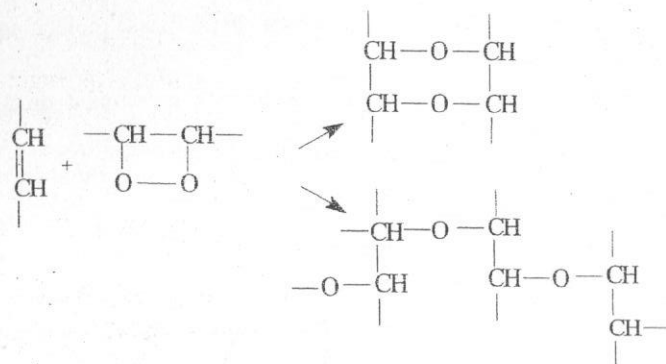
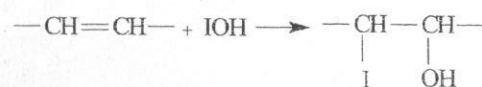
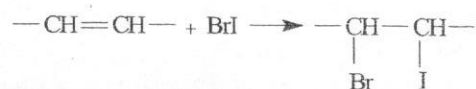
Reacțiile chimice ale gliceridelor au loc la nivelul grupei carboxilice libere sau esterificate și în catena acizilor grași.

La nivelul grupei carboxilice pot avea loc, printre altele, reacții de hidroliză, când acestea sunt esterificate și reacții de saponificare. Hidroliza gliceridelor se produce rapid sub influența catalizatorilor (baze, acid sulfuric, oxizi de magneziu, de zinc, enzime specifice etc.).

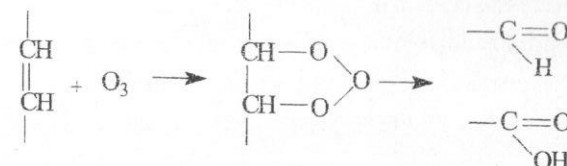
În urma hidrolizei alcaline, de exemplu, cu hidroxid de sodiu sau potasiu, gliceridele se transformă în glicerol și sarea de sodiu sau potasiu a acizilor grași, numite săpunuri, iar reacția poartă numele de saponificare:



Adiția este o proprietate a acizilor grași nesaturați. Legăturile duble ale acizilor grași din diversele gliceride, în anumite condiții, adăunează halogenii (clor, brom, iod), hidrogenul, oxigenul, sulful, acidul sulfuric, ca în exemplele de mai jos :



Ozonul adăunează la dubla legătură și se formează oxonide, care sunt instabile și trec în acizi și aldehide cu catene a căror lungime este cam jumătate din lungimea acidului gras de la care s-a plecat, deoarece majoritatea legăturilor duble sunt situate începând cu jumătatea lungimii catenei:



Uleiurile care conțin acizi grași nesaturați (acizii linolenic, linolic, oleostearic etc.), în contact cu aerul, în timp, își măresc consistența și, în strat subțire, formează pelicule. Proprietatea materiilor grase lichide de a se usca formând pelicule se numește *sicativitate*. Acțiunea oxigenului în procesul de sicativare se intensifică mult dacă sunt prezenți agenți de sicativare, cum sunt: săpunurile de cobalt, mangan, plumb, săpunurile rezinice și naftenice etc.

5.2.2. ACIZII GRAȘI

Acizii grași se găsesc în cantități foarte mari în lipidele saponificabile din plante, animale și microorganisme și doar sub formă de urme în unele celule și țesuturi.

În organism acizii grași au două roluri majore: în calitate de componente a multor complexe lipidice din membrane și în calitate de componente a rezervei de grăsime sub formă de trigliceride. Toți sunt formați din lanțuri lungi de hidrocarburi aciclice prezentând o grupă carboxil terminală.

La pH-ul fiziologic, grupa carboxil este în stare ionizată.

Lanțul hidrocarbonat poate fi saturat ca în acizii palmitic, stearic etc. (acizi grași saturați) sau poate avea una sau mai multe legături duble ca în acizii oleic, linoleic, linolenic etc. (acizi grași nesaturați). Număratoarea atomilor de carbon ai acizilor grași începe cu carbonul de la grupa carboxilică. Indicarea numerică, folosită pentru acizii grași, începe de la numărul atomilor de carbon, urmată de numărul pozițiilor nesaturate. De exemplu, acidul palmitic este un acid gras cu 16 atomi de carbon, este saturat și este numit prin 16:0.

Locul de nesaturare în acizii grași este indicat cu simbolul Δ și numărul primului atom de carbon a dublei legături. Astfel, acidul oleic este un acid care are 18 atomi de carbon și o legătură dublă între carbonii 9 și 10 și este notat cu simbolul numeric 18:1^{Δ9}.

Dublele legături sunt cis dacă nu este nici o altă precizare suplimentară.

Cei mai mulți acizi grași, din plante și animale, au un număr par de atomi de carbon, cu lanțuri ce au 4 până la 26 atomi de carbon, predominând cei cu 16–18 atomi de carbon.

Acizii grași cu număr impar de atomi de carbon se găsesc doar sub formă de urme la animalele terestre și în cantități mai mari în organismele marine. Astfel de acizi grași cu număr impar de atomi de carbon sunt: acidul izovaleric (C₅H₁₀O₂), acidul daturic (C₁₇H₃₄O₂) și izomerul său, acidul dorosonic.

Acizii grași saturați cu mai puțin de opt atomi de carbon sunt lichizi la temperatura fiziologică, iar cei cu mai mulți atomi de carbon sunt solizi. Prezența dublelor legături în acizii grași coboară semnificativ punctul de topire față de acizii grași saturați. Majoritatea acizilor grași din organism provin din alimentație, cu toate că celulele organismului pot sintetiza diferiți acizi grași necesari, cu excepția acizilor linoleic și γ -linolenic care sunt considerați *acizi grași esențiali* și nu pot fi obținuți decât din alimentație. La om, acizii grași esențiali pot fi obținuți consumând diferite plante sau carnea animalelor care s-au hrănit cu astfel de plante. Acidul linoleic reprezintă 10–20% din totalul de acizi grași din compoziția trigliceridelor și fosfogliceridelor.

Acizii grași esențiali sunt precursori ai biosintezei prostaglandinelor, compuși de tip hormonal, care în cantități foarte mici au efecte însemnate asupra

activității fiziologice. În tabelul 5.1. se dau principalii acizi grași importanți din punct de vedere fiziologic. Acizii grași nesaturați dau reacții de adiție la legăturile duble pe care le conțin. Titrarea cantitativă, cu iod sau brom, determină numărul relativ de legături duble din acizii grași sau lipide.

Dintre toți acizii grași din grăsimile naturale, acidul oleic este cel mai răspândit. În foarte multe grăsimi el reprezintă mai mult de jumătate din totalul greutateii acizilor și numai în puține grăsimi apare în proporție mai mică de 10 %. Acidul palmitoleic și acidul linolic, acidul stearic, acidul miristic sunt extrem de răspândiți, dar într-o proporție mai mică decât acidul oleic.

Acidul stearic se găsește într-o proporție de circa 25% în grăsimile de rezervă ale unor mamifere terestre și în grăsimile unor plante tropicale, cum este untul de cacao.

Tabelul 5.1.

Principalii acizi grași fiziologici

Simbolul numeric	Nume	Structura chimică
Acizi grași saturați		
12 : 0	Acid Lauric	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH
14 : 0	Acid miristic	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH
16 : 0	Acid palmitic	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
18 : 0	Acid stearic	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH
20 : 0	Acid arahic	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH
24 : 0	Acid lignoceric	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH
Acizi grași nesaturați		
16 : 1 ^{Δ9}	Acid palmitoleic	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH
18 : 1 ^{Δ9}	Acid oleic	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH
18 : 2 ^{Δ9,12}	Acid linoleic	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH = CHCH ₂ CH = CH(CH ₂) ₇ COOH
18:3 ^{Δ9,12,15}	Acid linolenic	CH ₃ CH ₂ CH = (CHCH ₂ CH) ₂ = CH(CH ₂) ₇ COOH
20 : 4 ^{Δ5,8,11,14}	Acid arahidonic	CH ₃ (CH ₂) ₃ (CH ₂ CH = CH) ₄ (CH ₂) ₃ COOH

Lecitinele sunt solubile în alcool și eter, iar cefalinele numai în eter. Datorită caracterului lor de ioni bipolari formează soluții coloidale în apă. Fosfatidele sunt agenți cu activitate superficială și prin aceasta au un rol important de regulatori ai permeabilității membranelor celulare. De asemenea, contribuie la transportul grăsimilor în organismul animal, probabil și la formarea grăsimii din lapte în glanda mamară.

Acetalii fosfatidici, plasmalogenii, care însoțesc fosfogliceridele în multe organe, mai ales în complexul de membrană celulară, seamănă structural cu fosfolipidele și mai ales cu fosfatidilcolina. Principala diferență este la acidul gras de la C-1 (sn1) al glicerolului care conține o O-alchil (-O-CH₂) sau O-alchenil eter (-O-CH=CH-).

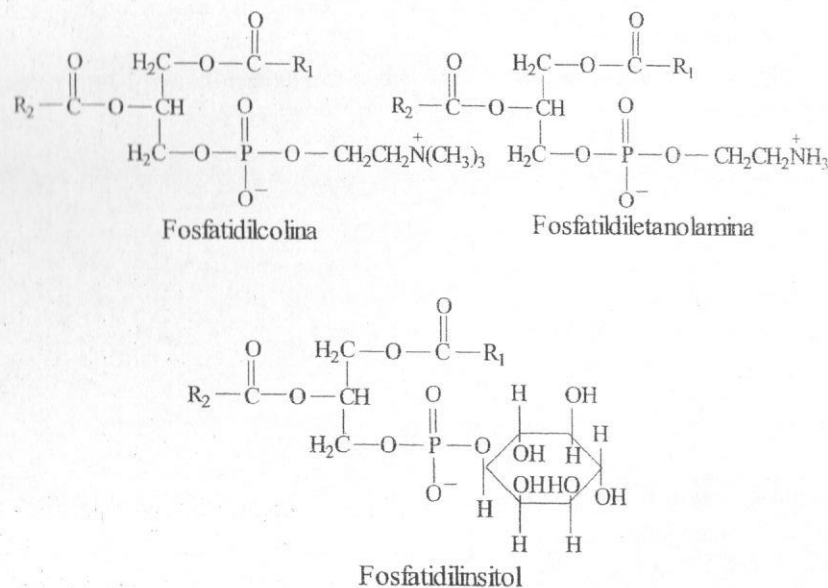


Fig.5.4. Unele fosfogliceride mai răspândite în plantele superioare și animale

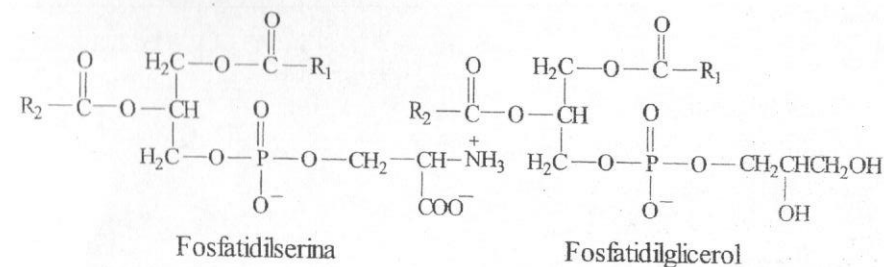
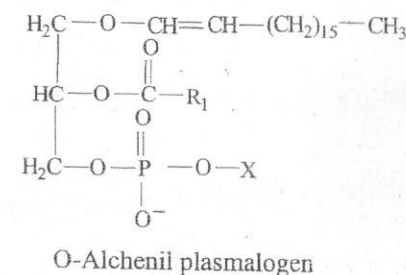


Fig.5.4.- continuare

Un exemplu cu O-alchenil eter este dat mai jos:

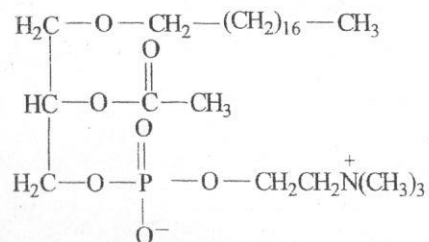


Unul dintre O-alchil plasmalogenii importanți este factorul de activare a trombocitului: PAF (1-O-1-enil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolină), care funcționează ca mediator al hipersensibilității, al reacțiilor acute inflamatorii și al șocului anafilactic. Sinteza și eliberarea PAF (pag.532) se produce ca replică în ficat, inimă, mușchii netezi, în țesuturile uterine.

5.2.6. SFINGOLIPIDELE

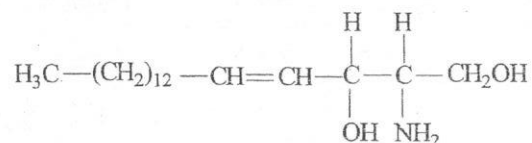
Sfingolipidele sunt lipide complexe care au o catenă principală sfingozina sau un compus înrudit (Fig.5.5.) [1]. Ele sunt componente importante ale membranelor celulelor animale și vegetale.

Cantitățile cele mai mari de sfingolipide se găsesc în creier și în țesutul nervos, în timp ce în grăsimile de depozit se găsesc doar sub formă de urme.

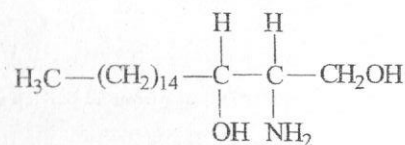


1-O-1-enil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolin.
Structura PAF

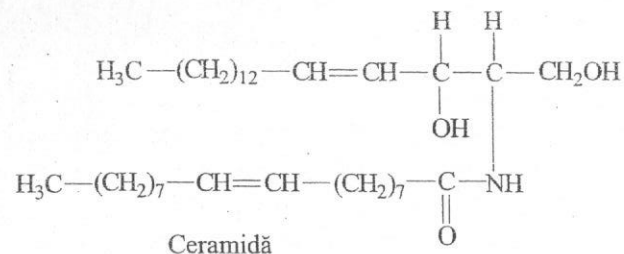
Fig.5.5. Baze sfingozinice și ceramidă



Sfingozina (4-sfinganină)



Dihidrofingozina (sfinganină)



Ceramidă

Sfingolipidele sunt constituite dintr-o moleculă de acid gras, o sfingozină sau un derivat al acesteia și la capăt o grupare polară.

Sfingozina este unul din amino-alcoolii din sfingolipidele identificate. La mamifere cele mai frecvente sunt sfingozina (4-sfingenina) și dihidrosfingozina (sfinganina).

Sfingozina se leagă cu gruparea sa aminică printr-o legătură amidică de un acid gras saturat sau nesaturat cu lanț lung de 18–26 atomi de carbon formând *ceramida*.

5.2.6.1. SFINGOMIELINELE

Sfingomielinele sunt sfingolipidele care se găsesc în cantitate mare în țesuturile animalelor superioare.

Ele au drept grupare polară esterificată cu gruparea 1-hidroxil dintr-o ceramidă, fosforil-colamina sau fosforil-colina (Fig.5.6.).

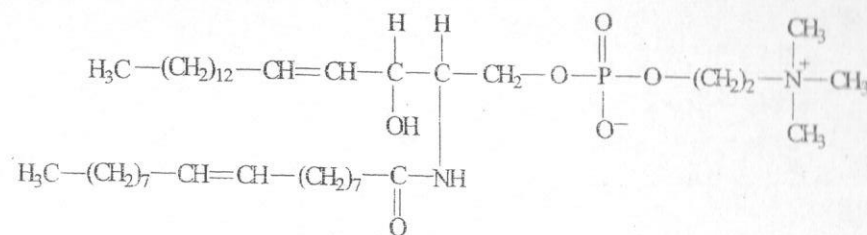


Fig.5.6. Sfingomielină

Proprietățile fizice ale sfingomielinelor sunt foarte asemănătoare cu cele ale fosfatidilcolaminei și fosfatidilcolinei.

5.2.6.2. GLICOSFINGOLIPIDELE NEUTRE

Glicosfingolipidele neutre au ca grupări polare una sau mai multe glucide și deci nu sunt încărcate electric.

Glicosfingolipidele neutre sunt componente ale suprafeței celulare din țesuturile animale. Unele glicosfingolipide neutre se găsesc la suprafața eritro-

citelor, cărora le conferă specificitatea de grup sanguin.

Cele mai simple glicosfingolipide neutre sunt *cerebrozidele*, care au capul polar format dintr-un monozaharid legat β -glicozidic de gruparea hidroxil a ceramidei (Fig.5.7.) [1]. Acizii grași din structura cerebrozidelor au 22-26 atomi de carbon. Cerebrozidele din creier și din sistemul nervos conțin D-galactoză și se numesc *galactocerebrozide*.

Cerebrozidele se găsesc în cantități foarte mici în celelalte țesuturi și conțin D-glucoză în loc de D-galactoză și de aceea se numesc *glucocerebrozide*. În creier se găsesc și esteri sulfat ai galactocerebrozidelor, în poziția 3 a D-galactozei, care se numesc sulfatide [1].

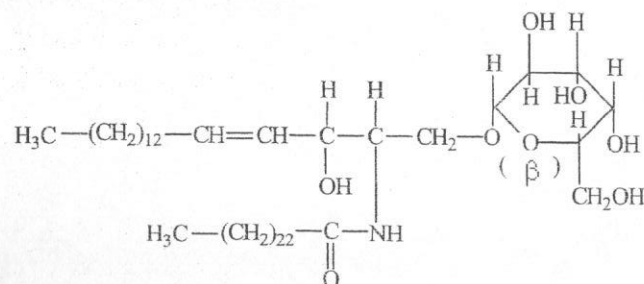


Fig.5.7. Galactocerebrozină

Unele glicosfingolipide neutre au ca grupări polare de cap o moleculă de dizaharid sau de trizaharid sau tetrazaharid și se numesc *dihexozide*, *trihexozide* sau *tetrahexozide*. Unitățile monozaharidice din glicosfingolipidele neutre sunt: D-glucosa, D-galactosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactozamina.

5.2.6.3. GLICOSFINGOLIPIDELE ACIDE

Glicosfingolipide acide (ganglioze) conțin în grupul oligozaharidic, ce formează capul polar, unul sau mai multe resturi de acid sialic, care conferă o sarcină negativă la pH = 7.

Gangliozele se găsesc în cantitatea cea mai mare în materia cenușie din

creier, unde reprezintă 6% din lipidele totale.

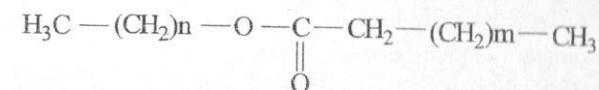
S-au identificat mai multe ganglioze, care se deosebesc între ele prin numărul și poziția radicalilor de hexoză și acid sialic care formează capul ganglioazelor. Aproape în toate gangliozele, glucoza este glucidul care se leagă glicozidic cu ceramida.

5.2.7. CERURILE

Cerurile sunt esteri ai acizilor grași superiori cu alcoolii monohidroxilici primari superiori sau cu sterolii.

Sunt solide, insolubile în apă, la rece sunt rigide, iar la cald sunt moi și pliable. Sunt insolubile în alcool etilic și solubile în mai mulți solvenți organici. Punctul lor de topire este mult mai ridicat decât cel al grăsimilor.

Structura lor poate fi reprezentată astfel :



Cerurile naturale conțin alături de cerurile propriu-zise, acizi grași liberi, hidrocarburi superioare neramificate $[(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})]$ în care $n=29-59$, alcoolii grași liberi, steroli etc.

Acizii grași frecvent întâlniți în cerurile naturale sunt: acidul carnaubic ($\text{C}_{25}-\text{H}_{47}-\text{COOH}$), acidul cerotic ($\text{C}_{25}-\text{H}_{51}-\text{COOH}$).

Alcoolii grași care intră în constituția cerurilor naturale sunt saturați și nesaturați.

Alcoolii grași saturați ($\text{C}_n\text{H}_{2n-2}\text{O}$) mai frecvenți sunt: alcoolul lauric, alcoolul miristic, alcoolul palmitic (cetic), alcoolul stearic, alcoolul carnaubic, alcoolul cerilic, alcoolul melisic. Alcoolul oleic ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{OH}$) este unul din mai puținii alcoolii grași nesaturați ce se găsesc în ceruri.

Acizii și alcoolii constituenți ai cerurilor au, în majoritate, un număr par de atomi de carbon.

Adesea, o ceară este alcătuită din alcoolul și acidul cu același număr de a-

tomi de carbon, de exemplu, stearatul de stearil ($C_{17}H_{35}-COO-C_{18}H_{37}$) din „albul de balenă” sau ceroatul de ceril ($C_{25}H_{51}-COO-C_{26}H_{53}$) din ceara de albine.

Cerurile au un indice de saponificare mult mai mic decât al grăsimilor, în schimb au un procent mult mai mare de nesaponificabile

Cerurile naturale mai importante sunt: ceara de albine, lanolina, ceara de Coșenița, albul de balenă, uleiul de spermaceti, ceara de Carnauba, ceara de Palma, ceara Japonica, ceara Candelilla.

Ceara de albine constă, în principal, din esterii acidului palmitic cu alcoolul miristic, acid cerotic liber și 10 % hidrocarburi.

Ceara de Carnauba se recoltează de pe frunzele palmierului *Copernicia cerifera* și este compusă, în special, din esterul acidului cerotic cu alcoolul miristic.

Lanolina, grăsimea de lână, este un amestec de esterii ai acizilor grași cu steroli ca lanosterolul și agnosterolul.

Albul de balenă este ceara solidă care se obține din grăsimea cetaceelor. Este compusă din esterii cetilici ai acizilor lauric, miristic, palmitic.

Ceara lichidă, numită și ulei de spermaceti este constituită din esteri ai alcoolului oleic cu acizi grași superiori nesaturați.

5.3. LIPIDELE SIMPLE

Lipidele simple nu conțin acizi grași. Ele se află în celule și țesuturi în cantități mai mici decât lipidele complexe, dar cuprind o serie de compuși de foarte mare importanță biologică (unele vitamine și hormoni și unele biomolecule liposolubile specializate).

5.3.1. TERPENELE

Terpenele sunt multipli ai izoprenului $\{CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2\}$. Terpenele formate din două molecule de izopren se numesc *monoterpene*, cele formate din trei molecule de izopren sunt *sescviterpenele*, cele din patru molecule de izopren se numesc *diterpene*, din șase molecule de izopren, *triterpene* și

din opt molecule, *tetraterpene*.

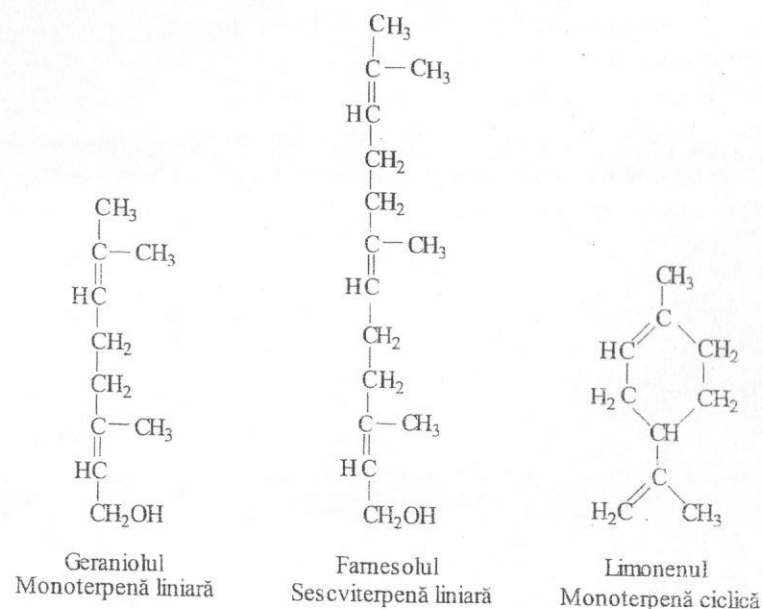


Fig. 5.8. Terpene liniare și ciclice.

Unele terpene sunt liniare, altele ciclice, iar unele au în alcătuirea lor ambele structuri (Fig.5.8. și Fig.5.9.).

Dintre terpenele identificate în plante, cu arome sau mirosuri caracteristice sunt monoterpenele: *camfor*, *carvonă*, *geraniol*, *limonen*, *mentol*, *pinen*, componente ale uleiurilor de camfor, chimion, mușcată, lămâie, mentă, terebentină.

Un reprezentant al sescviterpenelor este *farnezolul*, al diterpenelor este *fitolul* component al clorofilei, al triterpenelor este *squalenul* precursor în sinteza colesterolului. Dintre tetraterpene se menționează *carotinoidele* și în special β -*carotenul*, precursor al vitaminei A.

Dintre terpenele deosebit de importante sunt *vitaminele liposolubile A, E, K și D* (Fig.5.9.).

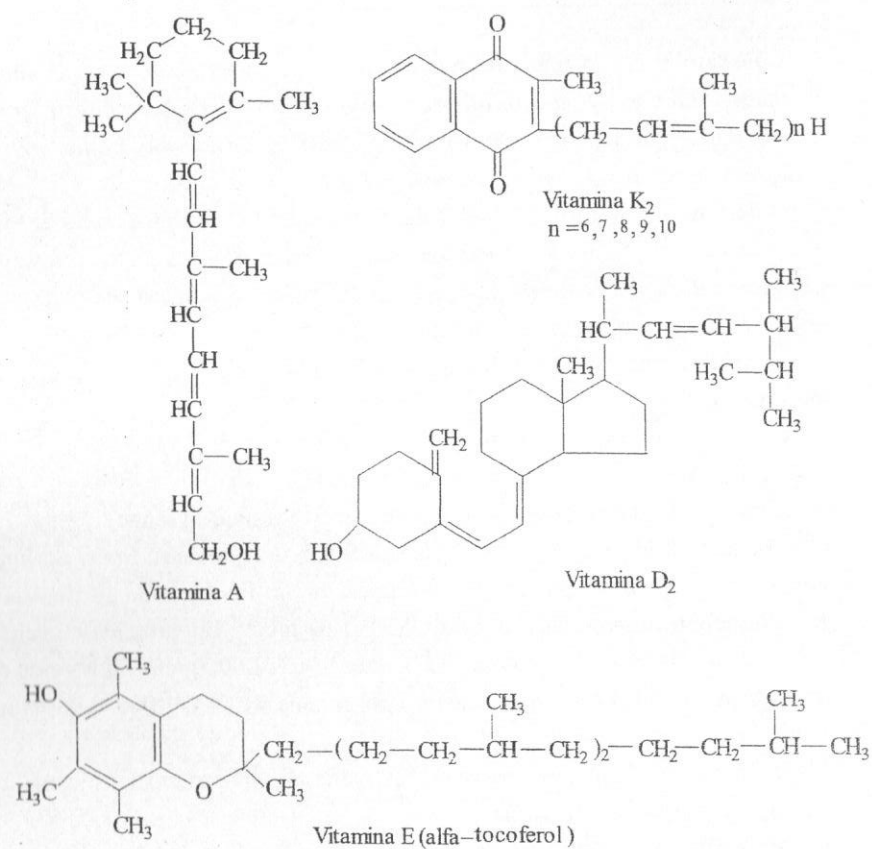


Fig.5.9. Vitaminele liposolubile A, D₂, K₂ și E, compuși izoprenoizi, lipide simple din categoria terpenelor.

5.3.2. STEROIDELE

Steroidele formează un grup mare de substanțe mult răspândite în natură și toate posedă scheletul de carbon tetraciclic al 1,2-ciclopenteno-perhidrofenantrenului (Fig. 5.10.).

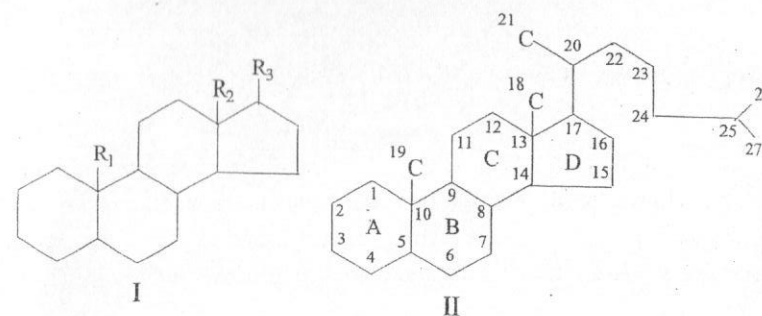


Fig.5.10. (I) 1,2-ciclopenteno-perhidrofenantren;
(II) scheletul colesterolului cu 27 atomi de carbon în moleculă.

Diferitele clase de sterioide se deosebesc între ele prin natura substituenților și gradul de nesaturare al nucleului tetraciclic, precum și prin natura catenelor laterale R₁ și R₃; R₂ este o grupă metil cu excepția aldosteronei.

Pozițiile substituenților din moleculele steroidelor se notează ca în formula II Fig.5.10, care este scheletul colesterolului cu 27 atomi de carbon în moleculă [2].

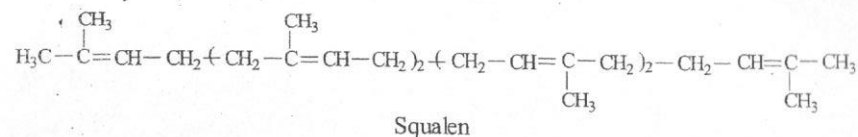
Nucleul ciclic al steroidelor (Fig.5.10. I și II) posedă șapte centre de asimetrie la C₅ din ciclul A, C₈, C₉ și C₁₀ din ciclul B, C₁₃, C₁₄ și C₁₇ din ciclul D. Punctele principale de substituție sunt: carbonul 3 din ciclul A, carbonul 11 din ciclul C și carbonul 17 din ciclul D.

Steroidele, după structura, originea și însușirile lor fiziologice se compun din mai multe subgrupe, care au același schelet ciclic, dar se deosebesc prin grupele funcționale și catenele lor laterale.

Din rândul steroidelor ne vom referi numai la *steroli* și la *acizi biliari*.

Sterolii sunt alcooli care se găsesc liberi sau esterificați cu acizi alifatici superiori în lipidele animalelor și plantelor. După proveniență, sterolii se pot clasifica în: *zoosteroli* (de la animale), *fitosteroli* (din plante), *micosteroli* (din drozdii și fungi), *steroli marini* (din bureți de mare).

Toți sterolii provin din triterpena liniară *squalen*:



Primul produs important al ciclizării squalenului este *lanosterolul*, precursorul *colesterolului*, care este sterolul ce se găsește în cantitatea cea mai mare la animale și joacă un rol central în numeroase procese biochimice (Fig.5.11.).

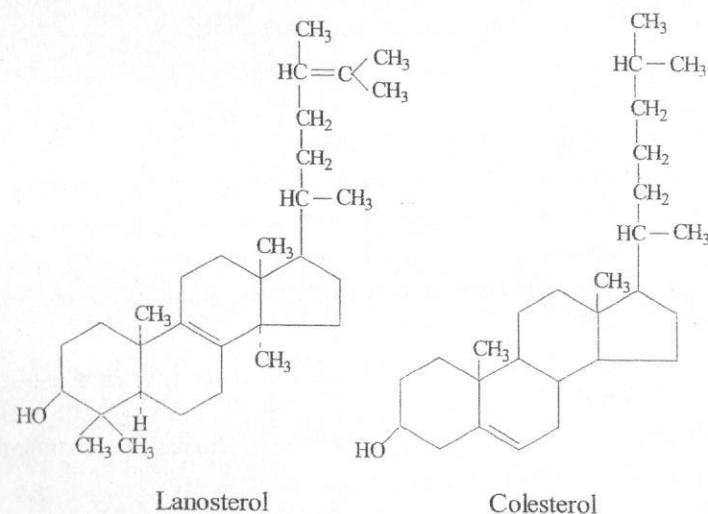


Fig.5.11. Sterolii lanosterolul și colesterolul

Molecula de colesterol conține patru cicluri notate cu A, B, C, D (Fig.5.10), 8 carboni asimetrici (carbonii 3, 8, 9, 10, 13, 14, 17 și 20), ceea ce face 2^8 sau 256 stereoizomeri, din care unul singur este levogir (3β -ol). Colesterolul posedă o grupă hidroxil la carbonul 3 (C_3), care este foarte hidrofobă și poate fi esterificată cu un acid gras, ceea ce face colesterolul total insolubil în apă.

Colesterolul este prezent sub formă de steroizi (colesterol esterificat) în cea mai mare parte a țesuturilor vertebratelor și în particular în ficat, creier și măduva spinării.

Colesterolul este precursorul multor alți steroli în țesuturile animale ca de exemplu: *vitamina D*, *acizii biliari*, *hormonii sexuali feminini*, *estrogenii* (*estradiolul*) și *gestagenii* (*progesterona*), *hormonii sexuali masculini*, *androgenii* (*testosterona*) și *hormonii adrenocorticali*.

Colesterolul are un rol deosebit de important în membrana celulară. Sinteza colesterolului în organism trebuie strict reglementată în vederea prevenirii supra acumulării și a depunerii anormale în organism. Depunerile de colesterol conduc la ateroscleroză, la boala arterelor coronariene.

Sinteza normală a colesterolului în corpul adultului sănătos este de 1g/zi și consumul de 0,3g/zi.

Nivelul normal al colesterolului în organism este de 150 – 200 mg / dl, care poate fi reglat, în parte, prin regimul alimentar.

Fiind un compus hidrofob, colesterolul nu este solubil în sânge.

Transportul său, ca și a altor lipide, este asigurat de patru tipuri de lipoproteide plasmatiche, grupate după densitatea lor în: lipoproteide cu densitate mare (high density proteins, HDL), de 1,21–1,63 g/cm³; lipoproteide cu densitate mică (low density lipoproteins, LDL), de 1,063–1,006 g/cm³; lipoproteide cu densitate foarte mică (very low density lipoproteins, VLDL), 1,006–0,96 g/cm³ și chilomicronii cu densitatea de 0,96 g/cm³.

În tabelul 5.2. sunt date câteva caracteristici ale lipoproteidelor plasmatiche și compoziția lipidică a fiecăreia.

Lipoproteidele cu densitate mare (HDL), numite și colesterol bun, descarcă arterele și țesuturile extrahepatice de colesterol și îl aduce înapoi la ficat unde este degradat.

Lipoproteidele cu densitate mică (LDL), numite și colesterol rău, transportă colesterolul de la locurile de secreție la celulele organismului. Cantități importante de colesterol transportate de LDL conduc la formarea de depozite de colesterol pe pereții arterelor, sub formă de plăci (aterom), care cresc riscul bolilor cardiovasculare.

Lipoproteidele cu densitate foarte mică (VLDL) sunt sintetizate în ficat și reprezintă forma de transport a trigliceridelor sintetizate de acest organ spre țesuturile extrahepatice. Cantități mici din aceste lipoproteide se formează și în

celulele intestinale.

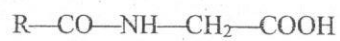
Chilomicronii sunt lipoproteidele care se formează în perioada digestiei. Ele sunt responsabile de transportul lipidelor de la intestinul subțire la țesuturi.

Tabelul. 5.2.

Caracteristici și compoziția lipidică a unor lipoproteide plasmatiche

Lipoproteide	Concentrația mg/100 ml	Mărimea (Å)	Lipide %	Proteine %	Frațiuni lipidice %		
					Fosfolipide	Coolesterol esterificat	Coolesterol liber
HDL	330	100 – 170	55	45	45	30	8
LDL	350	200 – 290	84	16	27	41	10
VLDL	150	300 – 900	93	7	20	15	8
Chilomicroni	0 - 50	1 000 - 5 000	99	1	8	3	1

Acizii biliari. Fiarea secretată de ficat conține o serie de acizi amidificați cu glicina sau taurina, cu structură steroidă, denumiți acizi biliari conjugați. *Acidul colic*, cel mai important acid biliar, combinat cu glicina sau cu taurina, poartă denumirea de acid glicocolic sau acid taurocolic:



Acid glicocolic

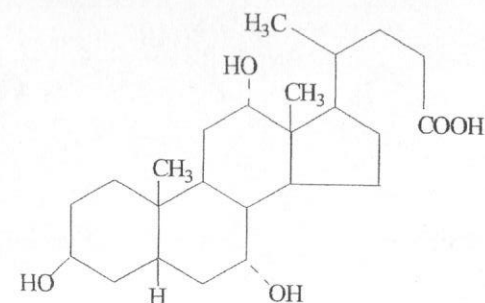


Acid taurocolic

Acești acizi amidificați se găsesc în fiere sub forma sărurilor lor de sodiu. Prin hidroliză rezultă acizii biliari propriu-ziși.

Principalii acizi biliari din fierea de om sunt:

- *Acidul colic* $C_{23}H_{39}O_3 - COOH$
- *Acidul dezoxicolic* $C_{23}H_{39}O_2 - COOH$
- *Acid litocolic* $C_{23}H_{39}O - COOH$



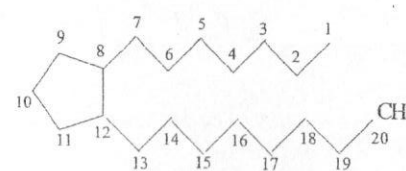
Acid colic

În fierea de om și a altor animale se găsesc și alți acizi biliari ca *acidul desoxicolic*, *acidul chenodesoxicolic*, *acidul litocolic* etc.

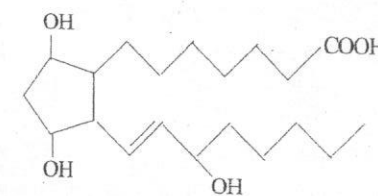
Acizii biliari amidificați, sub formă de sare de sodiu, au proprietatea de a solubiliza substanțe insolubile în apă, făcând posibilă trecerea lor prin mucoasa intestinală. Este cazul acizilor grași proveniți din grăsimi prin hidroliză, a unor gliceride nehidrolizate, β -carotina din hrană, vitamina K produsă de bacteriile intestinale etc.

5.3.3. PROSTAGLANDINELE

Prostaglandinele sunt derivați rezultați din ciclizarea acizilor grași nesaturați cu 20 de atomi de carbon, ca *acidul arahidonic*, care la rândul său provine din *acidul linoleic*. Atomii de carbon 8 – 12 din catena acidului gras formează un ciclu de 5 atomi de carbon (Fig.5.12.) [1].



Acid prostanoic



Prostaglandina F₁

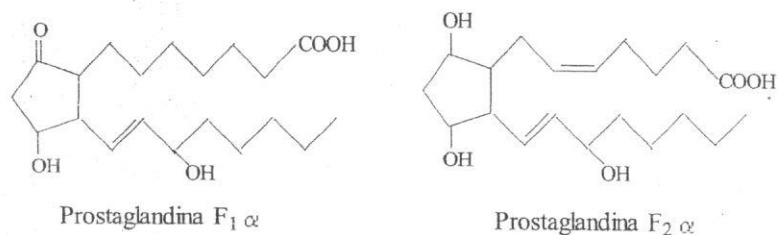


Fig.5.12. Acidul prostanoic și câteva prostaglandine care derivă din acid prostanoic

Prostaglandinele diferă între ele prin activitatea lor biologică. Toate produc mai mult sau mai puțin scăderea tensiunii sanguine și induc contracția mușchilor netezi.

Bibliografie selectivă

1. Lehninger A.L., *Biochimie*, vol. I și II, Ed. Tehnică, București, 1987, 1992
2. Nenițescu C.D., *Chimie Organică*, vol I și II, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1980
3. Chiriță A., *Produse Auxiliare și Coloranți*, Ed. Tehnică, București, 1988
4. Raven P.H., Johnson G.B., *Biology*, Third Edition, Wm.C.Brown publ. Dubuque, Iowa, 1995
5. Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., *Microbiology An Introduction*, Fifth Edition, The Benjamin / Cummings Publishing Co.Inc. Redwood City C.A., 1995
6. Mathews C.K.M., van Holde K.E., *Biochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Co.Inc., Redwood City C.A., 1990
7. Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., *A comprehensive classification system for lipids*, J.Lipid Res., 46(5), 2005

8. Vance J.E., Vance D.E., *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Elsevier, Amsterdam, 2002
9. Bach D., Wachtel E., *Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites*, Biochim. Biophys. Acta, 1610, 2003
10. Heinz E., *Plant glycolipids: structure, isolation and analysis*, in Advances in Lipid Methodology, ed. W.W. Christie, Oily Press, Dundee, 1996
11. Hölzl G., Dörmann P., *Structure and function of glycolipids in plants and bacteria*, Prog. Lipid Res., 46, 2007
12. Gurr M.I., Harwood J.L., *Lipid Biochemistry, An Introduction*, London, Chapman and Hall, 1991
13. Christie W.W., *Lipid analysis*, Oxford, Pergamon Books, 1982
14. Christie W.W., (ed), *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*, Somerset, The Oily Press, 1989
15. Christie W.W., *Gas Chromatography and Lipids*, Somerset, The Oily Press, 1990
16. Gupta M.N., *Manufacturing process for emulsifiers*, in Hui Y.H., Ed. Bailey's Ind. Oil and Fat Products, New York, John Wiley, vol. 4, 1996
17. Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Pusztai A., Bardocz S., (eds), *Handbook of Plant Lecitins: Properties and Biomedical Applications*, Chichester, John Wiley and Sons, 1998
18. Logan A.S., Nienber U., Pan S. Eds., *Lipid oxidation*, AOCS, 2016
19. Christie W.W., Han X., *Lipid Analysis*, Oily Press, 2016
20. Larsson K., Quinn P., Sato K., Tiberg F., *Lipids, Structure, Physical Properties and Functionality*, Oily Press, 2006
21. Iglic A., Kulkarni C.V., Rappolt M., *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, Academic Press, 2016
22. Gallova J., Klascova M., Devinsky F., Balgavy P., *Partial volumes of cholesterol and monounsaturated diacylphosphatidylcholines in mixed bilayers*, Chemistry and Physics of Lipids, Vol.190, 2015
23. Ledesma M.D., Martin M.G., Dotti G.C., *Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival*, Progress in Lipid Research, Vol.51,1, 2012
24. Brunham L.R., Hayden M.R., *Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function*, Progress in Lipid Research, Vol.58, 2015

25. Gomez-Munoz A., Presa N., Gomez-Larrauri A., Rivera G., et al. *Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate*, Progress in Lipid Research, 2016
26. Lennarz W.J., Lane M.D., *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2nd ed., Academic Press, 2013
27. Moo-Young M., *Comprehensive Biotechnology*, 2nd Ed., Pergamon, 2011
28. Dowhan W., Bogdanov M., Mileykovskaya E., *Functional Roles of Lipids in Membranes*, Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition), Academic Press, 2016
29. Moghis U.A., Xuebing Xu Eds., *Polar Lipids. Biology, Chemistry and Technology*, AOCS Press, 2015

CAPITOLUL 6

6. ACIZI NUCLEICI

6.1.	Noțiuni generale	548
6.2.	Pirimidine și purine	549
6.2.1.	Pirimidina	549
6.2.2.	Purina	551
6.3.	Nucleozide	553
6.4.	Nucleotide	555
6.5.	Acidul dezoxiribonucleic (ADN)	557
6.5.1.	ADN viral	565
6.5.2.	ADN bacterian	566
6.5.3.	Cromozomii eucariotelor	566
6.5.4.	Rolul genetic al ADN	569
6.5.5.	Proprietățile ADN în soluție	572
6.6.	Acidul ribonucleic (ARN)	574
6.6.1.	Acidul ribonucleic mesager (ARNm)	575
6.6.2.	Acidul ribonucleic de transfer (ARNt)	576
6.6.3.	Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr)	580
6.6.4.	Ribozomii	580
6.6.5.	Virusurile	581
6.7.	Acțiunea și interacțiunea genelor	583
6.7.1.	Reglarea activității genelor	589
6.8.	Măsurarea concentrației și purității acizilor nucleici	594
6.8.1.	Metode optice	594
6.8.2.	Metoda fluorescenței	594
6.9.	Păstrarea ADN	595
6.10.	Purificarea ADN	595
6.11.	Precipitarea ADN	595
6.12.	Izolarea ADN din Escherichia coli	596
6.13.	Izolarea plasmid ADN	597
	<i>Bibliografie</i>	599

6.1. NOȚIUNI GENERALE

Acizii nucleici se găsesc în toate celulele vii, inclusiv în virusuri. Ei au calitatea de a se reproduce întocmai și participă la biosinteza proteinelor. Datorită lor, diviziunea celulară duce la celule identice.

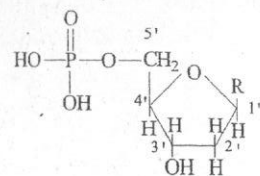
Acizii nucleici sunt molecule complexe produse de celulele vii și sunt esențiale pentru viața organismelor. Acești acizi guvernează dezvoltarea organismului și caracteristicile specifice provenite de la informațiile ereditare și activează sinteza proteinelor în celule. Ei asigură transmiterea caracterelor ereditare și identitatea, în timp, a indivizilor și a speciilor. În general, acizii nucleici sunt legați slab de proteine (protamine și histone).

Acizii nucleici se pot extrage cu apă sau cu soluții salină. Sunt compuși macromoleculari rezultați prin policondensarea unor unități simple, *nucleotide* sau *mononucleotide*. Acizii nucleici sunt *polinucleotide*.

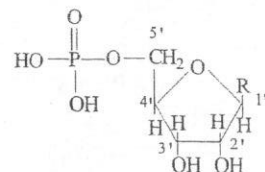
Nucleotidele pot fi considerate una dintre cele mai importante metabolite ale celulei. Ele sunt compuse din :

- o bază pirimidinică sau purinică;
- o monozaharidă și anume, o pentoză;
- un rest de acid fosforic esterificat cu unul din hidroxilii pentozei.

Acizii nucleici pot fi transformați în nucleotide prin hidroliză blândă, cu o soluție diluată de amoniac sau pe cale enzimatică cu *nucleaze*: *polinucleozidaze* (*ribonuclează* și *deoxiribonuclează*), *nucleotidaze* și *nucleozidaze*.



O deoxiribonucleotidă
R = o bază pirimidinică
sau purinică



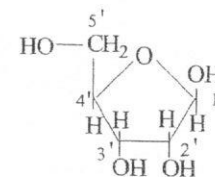
O ribonucleotidă
R = o bază pirimidinică
sau purinică

Supunând hidrolizei acizii nucleici sau nucleotidele cu soluții mai concentrate de amoniac sau nucleotidele cu nucleotidaze, se îndepărtează restul de

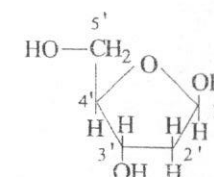
acid fosforic și se obțin nucleozide, care sunt compuse numai din baze pirimidinice și purinice și pentoze: *adenozină*, *guanozină*, *citidină*, *uridină* etc. Nucleotidele sunt deci *acizi nucleozid-fosforici*.

Sunt două tipuri de acizi nucleici: *acizii deoxiribonucleici* (ADN), care se găsesc în nucleele celulelor și *acizii ribonucleici* (ARN), care se găsesc mai ales în plasma celulară, dar în cantități mici și în nucleee.

Monozaharida din ADN este *2-dezoxi-D-riboza*, iar cea din ARN este *D-riboza*.



D-riboză



2'-Dezoxi-D-riboză

În ADN se găsesc două baze pirimidinice, *citozina* (C) și *timina* (T) și două baze purinice, *adenina* (A), și *guanina* (G). În ARN se găsesc aceleași baze purinice ca și în ADN, baza pirimidinică citozina, iar în locul timinei apare *uracilul* (U).

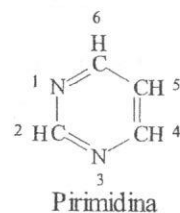
6.2. PIRIMIDINE ȘI PURINE

Combinațiile de la care derivă cele două clase de baze azotate din nucleotide sunt combinațiile heterociclice, *pirimidina* și *purina*.

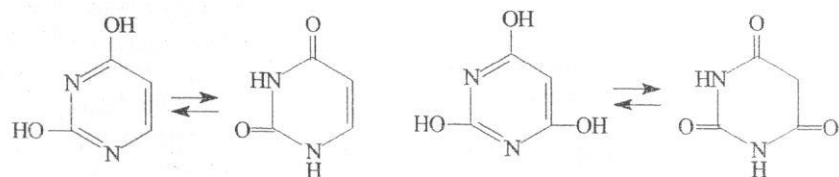
6.2.1. PIRIMIDINA

Inelul pirimidinic se găsește în natură sub formă de derivați hidroxilați sau condensat cu inelul benzenic (în *chinazoline*), cu inelul imidazolic (în *purine*), cu inelul pirazolinic (în *pteridine*) și cu inelul chinoxalinic (în *aloxazine*).

Derivații acestor sisteme ciclice se întâlnesc într-o serie de produși naturali (*vitamine*, *coenzime*, *acizi nucleici*).



Hidroxipirimidinele pot reacționa după două forme tautomere [1]:



2,4-Dihidroxipirimidină (uracil)

2,4,6-Trihidroxipirimidină

Structura tridimensională a diferitelor pirimidine, stabilită prin analiza de difracție cu raze X, arată că sunt molecule plane, în timp ce purinele sunt aproape plane, cu o ușoară deviație.

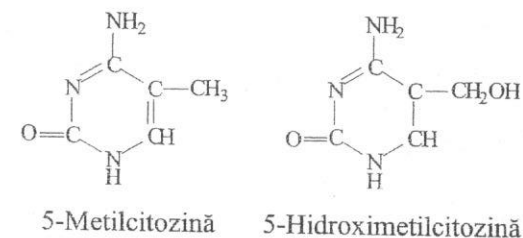
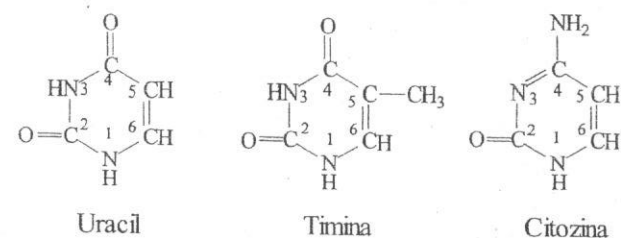
Pirimidina este un compus stabil, incolor, ușor solubil în apă, cu reacție neutră, iar cu acizii tari formează săruri.

Derivații simpli ai pirimidinei, substituiți la nucleu cu grupe alchil, aril, halogen și nitro, dar nu cu grupe hidroxil sau amino, au caracter aromatic și se comportă asemănător pirimidinei.

Substituenții legați la nucleul pirimidinic în poziția 5 reacționează, în general, la fel ca atunci când sunt legați de un nucleu aromatic. În pozițiile 2, 4 și 6, care sunt vecine cu atomii de azot, se observă abateri însemnate de la această comportare.

Hidroxipirimidinele au caracter acid, deoarece prin pierderea unui proton se obține un anion cu posibilități de conjugare mărite. Introducerea unei grupe NH_2 mărește bazicitatea moleculei.

Uracilul, timina și citozina sunt derivați pirimidinici și prezintă interes deosebit deoarece sunt produși de degradare ai acizilor nucleici.

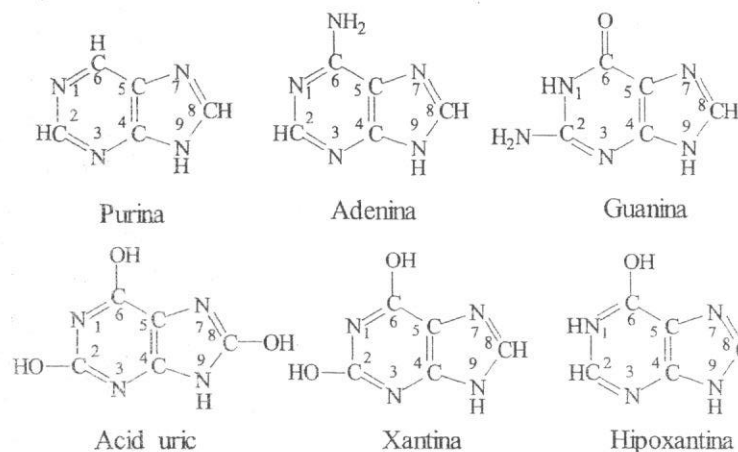


Pe lângă bazele obișnuite, prezentate mai sus, în acizii nucleici se mai găsesc, în cantități mici și alți derivați pirimidinici, așa zisele *baze rare*, așa cum sunt: 5-metil-citozina și 5-hidroxi-metil-citozina.

6.2.2. PURINA

Grupa purinei cuprinde produși naturali de importanță deosebită pentru fiziologia animală și vegetală. Astfel, *adenina*, o amino-purină și *guanina*, o hidroxi-amino-purină, sunt componente ale acizilor nucleici și se găsesc în concentrații mici și în stare liberă, în variate materiale de proveniență animală și vegetală: ficat, mușchi, urină, placentă, drojdie de bere, sfeclă de zahăr, ceai etc. Adenina este componenta unor nucleotide care îndeplinesc, în organismele vii, funcții de coenzime.

Prin dezaminarea și oxidarea biologică a adeninei și guaninei se formează trei hidroxipurine: *acidul uric*, *xantina* și *hipoxantina*, mult răspândite în natură.



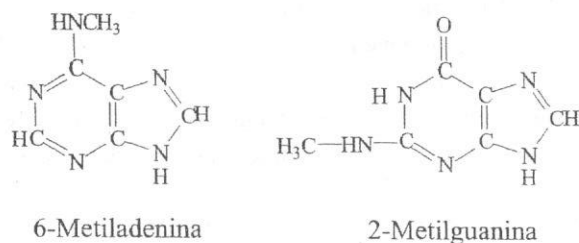
De la adenină derivă o grupă de compuși de mare importanță: *acizii adenozin fosforici, codehidrazele și diaforazele*.

Purina conține un sistem biciclic condensat compus dintr-un inel pirimidinic și un inel imidazolic. Are un caracter aromatic, mult atenuat la hidroxi-purine și aminopurine.

Purina formează cristale incolore, solubile în apă, neutre, rezistente la oxidare. Adenina și guanina sunt compuși cristalini, greu solubili în apă, se descompun la o încălzire de peste 300°C fără a se topi.

Cu hidroxizii alcalini formează săruri care sunt ușor solubile.

În afară de adenină și guanină, în acizii nucleici se mai găsesc, în cantități mici și alți derivați purinici, așa zisele *baze purinice rare*, printre care se menționează: *6-metiladenina și 2-metilguanina*.



În tabelul 6.1. se prezintă și alte *baze rare* din acizii nucleici care sunt derivați ai *bazelor majore* și conțin grupări metil, acetil, izopentil, hidroxi-metil [2].

Tabelul 6.1.
Baze rare din acizii nucleici

5,6 - Dihidroxiuracil	1 - Metiladenină
1 - Metiluracil	2 - Metiladenină
3 - Metiluracil	7 - Metiladenină
5 - Hidroximetiluracil	N ⁶ - Metiladenină
2 - Tiouracil	N ⁶ , N ⁶ - Dimetiladenină
N ⁴ - Acetilcitozină	1 - Metilguanină
3 - Metilcitozină	7 - Metilguanină
5 - Metilcitozină	N ² - Metilguanină
5 - Hidroximetilcitozină	N ² , N ² - Dimetilguanină

S-au găsit peste 30 de baze rare în acizii ribonucleici de transfer (ARNt), care reprezintă circa 10% din cantitatea totală de baze.

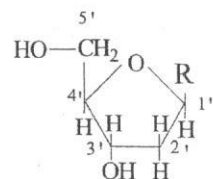
Toate bazele purinice și pirimidinice absorb puternic în ultraviolet, în domeniul 250 - 280 nm. Această proprietate este folosită la detectarea și analiza cantitativă a bazelor libere, precum și a nucleotidelor și nucleozidelor [2].

6.3. NUCLEOZIDE

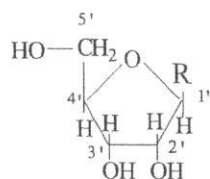
Există două serii de nucleozide: *ribonucleozidele*, care conțin ca parte glucidică D-riboza și *dezoxiribonucleozidele*, care conțin ca parte glucidică 2-dezoxi-D-riboză.

Nucleozidele sunt mult mai solubile în apă decât bazele corespunzătoare și sunt relativ stabile la alcalii.

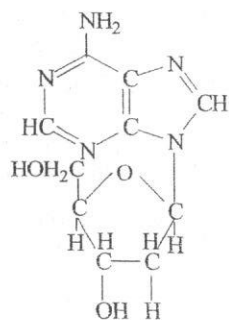
Nucleozidele purinice sunt ușor hidrolizate de acizi formând baze libere și pentoze, în timp ce nucleozidele pirimidinice sunt rezistente la hidroliza acidă. Nucleozidele în stare liberă se găsesc sub formă de urme în celule, ca produși ai hidrolizei enzimatic sau chimice a nucleotidelor.



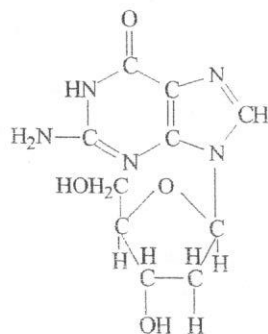
Dezoxiribonucleozidă
R = O bază purinică
sau pirimidinică



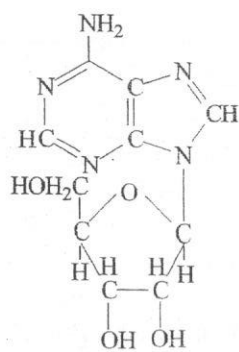
Ribonucleozidă
R = O bază purinică
sau pirimidinică



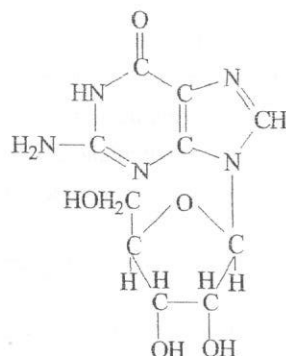
2'-Dezoxiadenozină



2'-Dezoxiguanozină



Adenozină



Guanozină

6.4. NUCLEOTIDE

Ribonucleotidele și dezoxiribonucleotidele, în stare liberă, se găsesc în cantități însemnate în celule, în deosebi în forma $N-O-PO_3^{2-}$, unde N = nucleozidul, dar și sub formă de difosfați și trifosfați.

Nucleotidele, ca și nucleozidele conțin două cicluri aproape plane: cel al bazei și cel al ribofuranozei. În conformația cea mai stabilă, cele două cicluri sunt aproape perpendiculare unul pe altul.

Resturile de pentoze din nucleotide se găsesc în formă furanozică.

Bazele purinice și pirimidinice sunt legate prin unul din atomii lor de azot la carbonul din poziția 1' al pentozei (legături β -glicozidice); deci, nucleotidele sunt N-glicozide [1].

Acizii nucleozid 5'-difosforici (NDP) și acizii nucleozid 5'-trifosforici (NTP) sunt acizi relativ puternici și eliberează din grupările fosfat condensate trei, respectiv, patru protoni (Fig.6.1.).

NTP este un transportor de fosfat și pirofosfat într-o serie de reacții enzimice implicate în transferul energiei chimice. NDP rezultat prin defosforilarea NTP este refosforilat la NTP în procesul respirației.

Sistemul ATP (adenozin 5'-trifosfat)-ADP (adenozin 5'-difosfat) este principalul sistem pentru transferul grupărilor fosfat în celule, dar și celelalte NTP (GTP, UTP și CTP) au rolul de a canaliza energia chimică pe anumite căi biosintetice specifice [2].

Altă funcție majoră a NTP și NDP este aceea de transportori energizanți de tip coenzimă ai unor elemente constitutive. De exemplu, uridin difosfatul (UDP) este un transportor specific pentru glucide în procesul de biosinteză al polizaharidelor.

O funcție majoră a NTP și dNTP este aceea de precursori bogați în energie a mononucleotidelor în biosinteza enzimatică a ADN și ARN. În acest proces, NTP și dNDP își pierd grupările pirofosfat terminale, transformându-se în resturi de nucleozid monofosfați, elemente constitutive ale acizilor nucleici. În toate cele trei funcții ale NTP și dNTP, energia chimică a legăturilor fosfat b și c (Fig.6.1.) este folosită la formarea unor legături covalente noi [2].

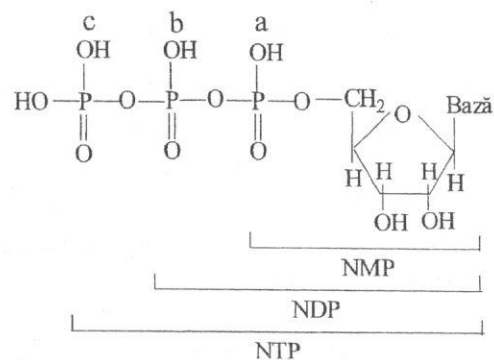
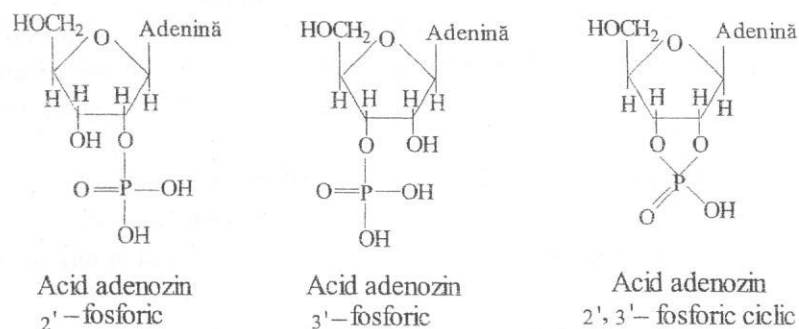


Fig.6.1. Structura generală a nucleozid 5'-mono-, 5'-di- și 5' trifosfaților (NMP, NDP, NTP). În dezoxiribonucleozid fosfații corespunzători (dNMP, dNDP și dNTP) pentoza este 2-dezoxi-D-riboza [2].

În natură există nucleotide care au grupările fosfat și în alte poziții decât în nucleozid 5'-fosfați, ca de exemplu, în acidul adenzin 2'-fosforic, acidul adenzin 3'-fosforic, acidul adenzin 2', 3'-fosforic ciclic:



Acizii dezoxiribonucleici (ADN) și ribonucleici (ARN).

Acidul dezoxiribonucleic (AND) este format din dezoxiribonucleotide, iar acidul ribonucleic (ARN) din ribonucleotide. La AND ca și la ARN nucleotidele succesive sunt legate covalent prin punți fosfodiesterice între gruparea

5'-hidroxil a unei nucleotide și gruparea 3'-hidroxil a nucleotidei următoare (Fig.6.2.).

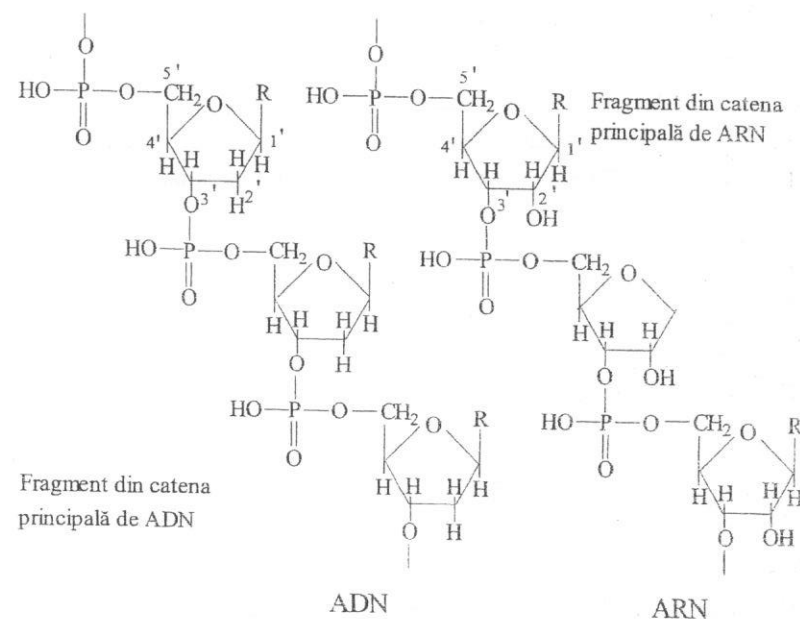


Fig.6.2. Structura covalentă a catenei principale a lanțurilor de acizi nucleici

Catena principală a ADN și ARN este formată din grupări fosforice alternând cu pentoze în formă furanozică; legăturile fosfodiesterice asigură continuitatea covalentă. Bazele pirimidinice și purinice ale nucleotidelor nu fac parte din catena principală; ele formează catene distincte la fel ca radicalii R ai aminoacizilor care sunt catene distincte ale polipeptidelor.

6.5. ACIDUL DEZOXIROBONUCLEIC (ADN)

Acidul dezoxiribonucleic (ADN) este materialul genetic din organismele celulare și din cele mai multe virusuri. În organismele celulare ADN se găsește pe cromozomi. Acidul dezoxiribonucleic a fost izolat din celulele și sperma de somon de către Friedric Miescher în 1869 și apoi au urmat 80-90 de ani de

cercetări, până la cunoșterea completă a structurii și a rolului său în organismele vii.

Moleculele de ADN din diferitele celule și virusuri se deosebesc prin masa lor moleculară, proporția celor patru tipuri de monomeri nucleotidici (Tabelul 6.2.) și prin secvența nucleotidelor [2].

Tabelul 6.2.

Procentul molar al bazelor în câteva preparate de acizi nucleici

	Adenină	Guanină	Citozină	Timină	Uracil
ADN					
Uman	30,9	19,9	19,8	29,4	-
Escherichia coli	24,7	26,0	25,7	23,6	-
ARN					
Ficat de bou (amestec)	17,1	27,3	33,9	-	21,7
Escherichia coli, în ARNm	25,1	27,1	24,1	-	23,7
Virusul mozaicului tutunului	20,8	25,4	18,5	-	26,7

Sunt enzime care clivează acizii nucleici la legătura de la C^{5'} formându-se mononucleotide fosforilate la C^{3'}, iar alte enzime duc la nucleotide fosforilate la C^{5'}.

Macromoleculele de ADN, de diferite proveniențe, conțin de la câteva mii la câteva milioane de resturi de mononucleotide. Astfel de molecule foarte mari pot fi văzute cu microscopul electronic și au înfățișarea unor fire foarte lungi. Acizii dezoxiribonucleici (ADN) de la mamifere au greutatea moleculară de $6-8 \cdot 10^6$, iar de la bacteria *Escherichia coli* de $1\,000 \cdot 10^6$ [1].

ADN poate fi obținut sub formă de fibre orientate, care la analiza cu raze X prezintă o perioadă de identitate de 3,4 Å, ceea ce indică o structură în care resturile plane de purine și pirimidine (R din formulele din Fig.6.2.) sunt situate perpendicular pe axa fibrei, suprapuse ca monedele într-un fâșic, iar inelele de pentoză sunt în planuri paralele cu axa fibrei. Două asemenea catene

sunt răsucite în forma unei duble elice, având o axă comună (J.D. Watson, F.H.C. Crick). Ambele elice sunt de dreapta și au 10 resturi de nucleotide pe spiră, iar diametrul moleculei este de 20 Å (Fig.6.3.) [1] și prezintă o canelură mare și una mică (Fig.6.4.) [3].



Fig.6.3. Dublă elice de ADN.

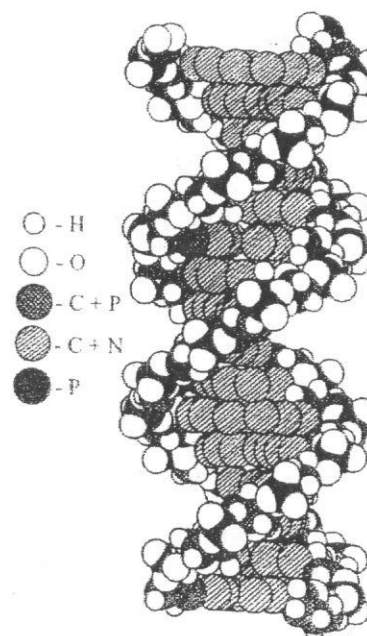


Fig.6.4. Segment din moleculă de ADN dublu helicoidală (după Sager și Ryan, 1963).

H = hidrogen, O = oxigen,
C + P = carbonul și fosforul din
lanțul de esteri fosfatici,
C + N = carbonul și azotul din
bazele purinice și pirimidinice,
P = fosfor [3].

Cele două catene antiparalele ale ADN dublu helicoidale nu sunt identice în ceea ce privește secvența și compoziția bazelor pirimidinice și purinice și secvența nucleotidică, iar sensul de citire este de la 5' la 3' (Fig.6.5.).

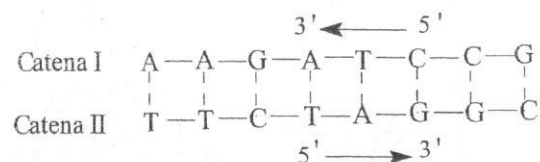


Fig.6.5. Polaritatea catenelor ADN

Fiecare lanț polinucleotidic are o polaritate: la un capăt are hidroxilul din poziția 5' liber și la celălalt capăt are hidroxilul 3' liber. Cele două lanțuri polinucleotidice sunt antiparalele, adică un lanț are direcția 5' → 3' și celălalt 3' → 5' (Fig.6.6.). Secvența bazelor dintr-un lanț poartă informația genetică.

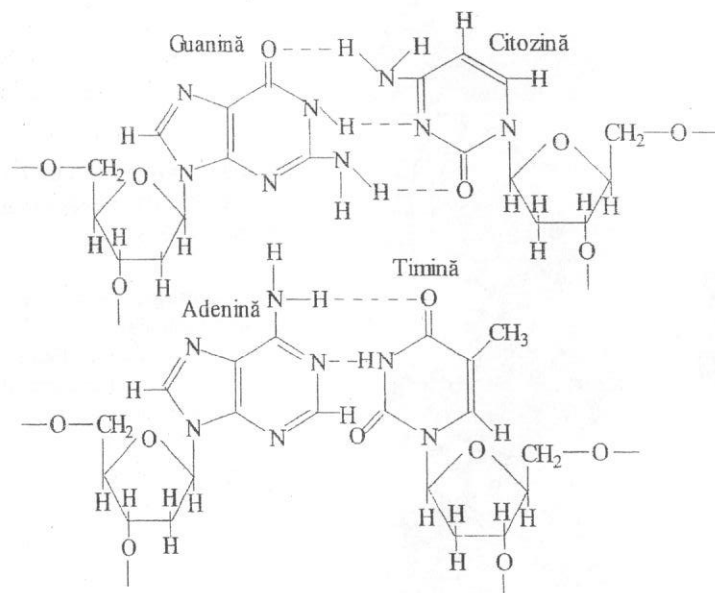


Fig.6.6. Legăturile de hydrogen dintre bazele pirimidinice și purinice din două catene paralele de acizi nucleici

La o anumită secvență a bazelor dintr-un lanț îi corespunde o secvență precisă a bazelor din celălalt lanț. De exemplu, la secvența TCCG corespunde în lanțul opus AGGC.

În modelul ADN din Fig.6.4. cele două elice sunt orientate cu resturile de purină și pirimidină spre interior. Fiecare rest de purină stă în fața unui rest de pirimidină și sunt legate între ele prin legături de hidrogen [două legături de hidrogen între adenină (A) și timină (T) și trei legături de hidrogen între guanină (G) și citozină (C)] (Fig.6.6. și Fig.6.7.).

Unui rest de adenină (A) dintr-o elice îi corespunde în elicea paralelă unul de timină (T), iar unui rest de guanină (G) îi corespunde un rest de citozină (C). Perechile de resturi pirimidinice și purinice ce se pot lega între ele sunt limitate la două (A..T și G..C). Unei anumite succesiuni a resturilor pirimidinice și purinice dintr-o elice îi corespunde o succesiune exact determinată în cealaltă, cele două elice sunt complementare și au sens opus (Fig.6.7.).

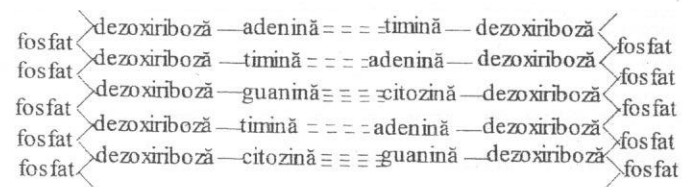


Fig.6.7. Împachetarea resturilor de purine și pirimidine între cele două catene ale dublei elice de ADN [2].

Structura dublu helicoidală a ADN propusă de Watson și Crick conduce la mecanismul prin care informația genetică poate fi replicată fidel. Întrucât cele două catene ale ADN sunt complementare, deci conțin informație complementară, s-a emis ipoteza că replicarea ADN în cursul diviziunii celulare are loc prin replicarea celor două catene, astfel încât fiecare catenă inițială să servească ca matriță, care specifică secvența bazelor purinice și pirimidinice din catena complementară nou formată.

Rezultatul final al acestui proces este formarea a două molecule dublu helicoidale fiice de ADN pirimidinice din catena complementară nou formată.

Au fost cercetate, în mod deosebit, ADN-urile din bacteriofagii λ și ΦX 174 ai *E. coli*. Primul este un ADN dublu helicoidal liniar, cu o masă moleculară de 32 milioane. Lungimea conturului său, determinat prin microelectronografie, este de 17,2 μm . ADN din virusul ΦX 174 este unul din cele mai mici ADN-uri cunoscute, este monocatenar, are formă circulară, cu lungimea conturului de 1,77 μm și cu o masă moleculară de 1,7 milioane. Unele tipuri de ADN virale liniare nu conțin o secvență unică de baze purinice și pirimidinice, fiind constituite din molecule ale căror secvențe sunt rezultatul unor permutații circulare.

La ADN-urile virale unele dintre bazele lor pirimidinice și purinice sunt modificate. Astfel, bacteriofagii T-par conțin hidroxitilcitozină în loc de citozină, iar gruparea hidroxil a hidroxitilcitozinei este uneori glicozilată.

6.5.2. ADN BACTERIAN

Moleculele de ADN din bacterii sunt de dimensiuni mari. Cromozomul de la *E. coli* se prezintă ca o moleculă foarte mare de ADN dublu helicoidal, cu greutatea moleculară de $2,8 \cdot 10^9$ daltoni, o grosime de 2 nm și o lungime a conturului de circa 1360 μm . ADN de la *E. coli* conține circa 4 milioane de perechi de nucleotide, fiecare pereche având o masă moleculară medie de 670.

Unele bacterii mai conțin, în afară de moleculele enorme de ADN din cromozomi, încă 1 până la 20 de molecule mici de ADN circular dublu helicoidal, cu dimensiuni de 5–100 megadaltoni, asemănătoare ADN-urilor virale.

6.5.3. CROMOZOMII EUCARIOTELOR

Cromozomii, structuri microscopice din celule, care conțin moleculele de acid dezoxiribonucleic (ADN), material ereditar, care influențează dezvoltarea și caracteristicile fiecărui organism. La bacterii, cromozomii constau din simple spire de ADN, care plutesc libere în celule. La eucariote, cromozomii se găsesc în nucleul celulei, au structuri mult mai complexe, iar forma moleculei de ADN este liniară (Fig.6.10.).

Fiecare cromozom conține câte o moleculă foarte mare de ADN. Se știu mai puține informații referitoare la moleculele individuale de ADN din cromozomii celulelor organismelor superioare. La musculița de oțet *Drosophila*, cromozomul este o moleculă liniară de ADN dublu helicoidal, cu o lungime de circa 4 cm și o masă moleculară de aproximativ $80 \cdot 10^9$. Molecula de ADN din cromozomul celulelor de mamifere conține $5,5 \cdot 10^9$ perechi de baze pirimidinice și purinice.



Fig.7.10. Cromozom

Tabelul 6.3.

Numărul de cromozomi diploizi la diferite specii

<i>Procariote</i>	
Bacterii	1
<i>Eucariote</i>	
Trifoi	14
Mazăre	14
Grâu	20
Om	46
Iepure	44
Pisică	38
Vulpe	34

În celulele celor mai multe organisme, care se reproduc sexual, cromozomii se găsesc în perechi. Un cromozom este moștenit de la femela mamă și unul de la masculul tată. Ambii cromozomi ai fiecărei perechi conțin gene care

corespund la aceleași caracteristici moștenite. Fiecare pereche de cromozomi este diferită de oricare altă pereche de cromozomi din aceeași celulă.

Numărul perechilor de cromozomi din celulele diferitelor organisme se modifică în funcție de specie. Numărul caracteristic de cromozomi din celulele unui organism este cunoscut ca *număr diploid* (Tabelul 6.3.) [2].

Câinele, de exemplu, are 38 de perechi de cromozomi și numărul diploid de 76, iar tomatele au 12 perechi de cromozomi și numărul diploid de 24.

Celulele sexuale (oul și sperma) conțin numai jumătate din numărul de cromozomi găsiți în alte celule ale organismului. Acest număr redus de cromozomi din celulele sexuale este cunoscut ca *număr haploid*. În timpul fertilizării, un ou și un spermatozoid se unesc și formează *celula zigot*, prima celulă a copilului. Zigotul conține numărul diploid de cromozomi caracteristic speciei.

Celulele celor mai multe organisme au seturi complete de perechi cromozomale combinate.

La mamifere, păsări și la alte organisme, o pereche de cromozomi este absolut la fel. Cunoscută ca sex-cromozomi această pereche joacă un rol dominant în determinarea sexului organismului. Cel feminin are două copii de cromozomi X, în timp ce cel bărbătesc are un cromozom Y și un cromozom X. Oamenii au 23 de perechi de cromozomi, cu un număr diploid de 46. Cel mai mare este cromozomul 1 și cel mai mic este 23 (Fig.6.11.)

Organizarea ultrastructurală a ADN în interiorul nucleului celulelor eucariote este complexă, suferind schimbări însemnate în cursul ciclului celular. În interfază, perioada dintre mitoze, nucleii celulelor eucariote conțin o rețea neregulată de *fibre de cromatină* (denumirea de cromatină vine de acolo că aceste fibre se colorează în prezența coloranților bazici).

Fibrele de cromatină, cu un diametru de circa 20 nm, sunt formate dintr-un ADN dublu helicoi-dal, strâns înconjurat de histone (proteine bazice), precum și de proteine acide, enzime (ADN-polimeraza), ADN nuclear și unele lipide.

Grupări hidroxilice de la resturile de serină din structura histonelor sunt fosforilate enzimatic cu ajutorul *protein kinazei*. Moleculele de histone par a

fi aranjate regulat în canelura mare a ADN dublu helicoidal (Fig.6.4.).

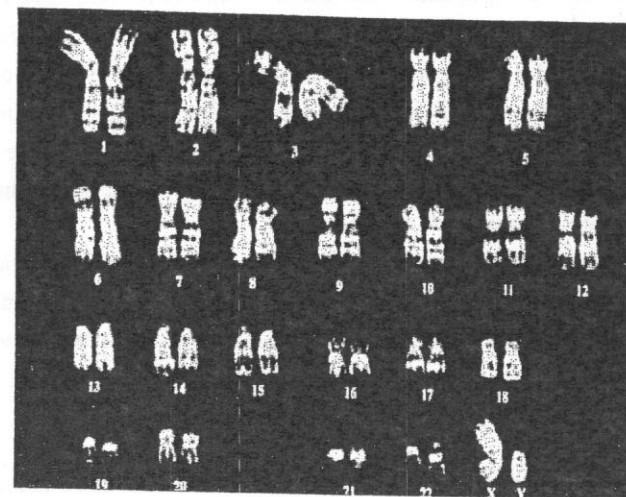


Fig.6.11. Cele 23 de perechi de cromozomi din nucleul celulei umane bărbătești.

Sarcinile pozitive ale histonelor, care se repetă periodic, determină asocierea electrostatică a acestora cu grupările fosfat încărcate negativ ale ADN, ceea ce conferă o mai mare stabilitate și flexibilitate moleculei de ADN.

Helixul dublu de ADN, împreună cu histonele asociate, este suprarăsucit și pliat în fibrele de cromatină.

Mitocondria din celulele eucariote conține ADN diferit de cel din nucleu. ADN mitocondrial este dublu catenar și circular, are masa moleculară în jur de 10 milioane, compoziția în baze purinice și pirimidinice diferită de a ADN nuclear și reprezintă mai puțin de 1% din cantitatea totală de ADN celular.

6.5.4. ROLUL GENETIC AL ADN

ADN este forma principală de stocare a informației genetice în celule, care este înmagazinată și transmisă celulelor fiice prin procesul de replicare.

(Fig.6.8.) [3].

Mecanismul replicării ADN, în care, în fiecare moleculă de ADN nou formată unul din lanțuri provine din molecula inițială, iar celălalt lanț este nou inițiat se numește *replicare semiconservativă*.

La replicarea ADN, dezrăsucirea celor două lanțuri polinucleotidice din dublul helix al ADN este favorizată de ruperea unuia din cele două lanțuri, riboză-fosfat, la o distanță de circa 30 Å de la locul în care nu s-a produs dezrăsucirea. Dezrăsucirea este ușurată și de prezența unor proteine specifice de dezrăsucire care se leagă una după alta de ADN monocatenar.

Pe măsură ce are loc dezrăsucirea, pe fiecare din cele două lanțuri polinucleotidice se sintetizează un nou lanț cu o secvență complementară de nucleotide. ADN-ul nou sintetizat se formează ca fragmente mici, de circa 1000 de nucleotide, care se leagă apoi între ele.

La biosinteza ADN intervin enzimele: *ARN-polimeraza*, trei *ADN-polimeraze* (I, II și III) și *ADN-ligaza*.

ARN-polimeraza sintetizează câte un fragment scurt de ARN (circa 100 de nucleotide) pe ambele lanțuri de ADN dezrăsucit, care servesc ca matriță. Rezultatul acțiunii ARN-polimerazei este un *primer* de ARN cu grupa 3' OH liberă, care este necesar pentru începerea sintezei ADN cu ajutorul ADN-polimerazelor (4).

ADN-polimeraza I catalizează trei reacții diferite:

- Cuplarea pas cu pas a dezoxiribonucleotidelor la un primer de ADN sau ARN având gruparea 3' OH liberă. În afară de primer este necesară și prezența unui lanț de ADN matriță. În reacție se produce scindarea nucleozidtrifosfatului cu eliberarea pirofosfatului, concomitent cu legarea unității nucleozidice la primer (Fig.6.9.) [4].
- ADN-polimeraza I catalizează activitatea 3'→5' exonucleazică prin care se îndepărtează câte un mononucleotid ce are grupă 3' OH liberă în cazul când acesta nu este complementar bazei de pe celălalt lanț. Se produce astfel corectarea unui nucleotid greșit de la capătul primerului.

- ADN-polimeraza-I catalizează activitatea 5'→3' nucleazică prin care se îndepărtează mai multe nucleotide dinspre capătul 5' terminal dintr-un lanț de ADN dacă fragmentul respectiv nu este complementar lanțului matriță.

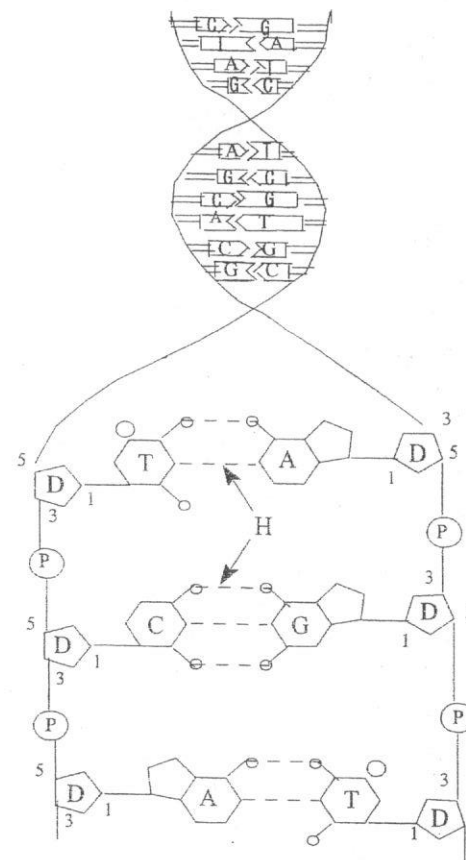


Fig.6.8. Segment din molecula de ADN dublu helicoidală. D=dezoxiriboza, P=acidul fosforic, A=adenina, G=guanina, T=timina, C=citozina.

ADN-polimerazele II și III nu catalizează activitatea 5'→3' nucleazică și au activitate optimă pentru o matriță de ADN dublu helicoidală în care nu sunt

întreruperi prea mari.

ADN-polimeraza III are un rol esențial în biosinteza ADN.

ADN-ligaza catalizează formarea unei legături fosfodiesterice între două capete (unul cu OH în 3' și altul cu un fosfat în 5') ale unor fragmente de ADN.

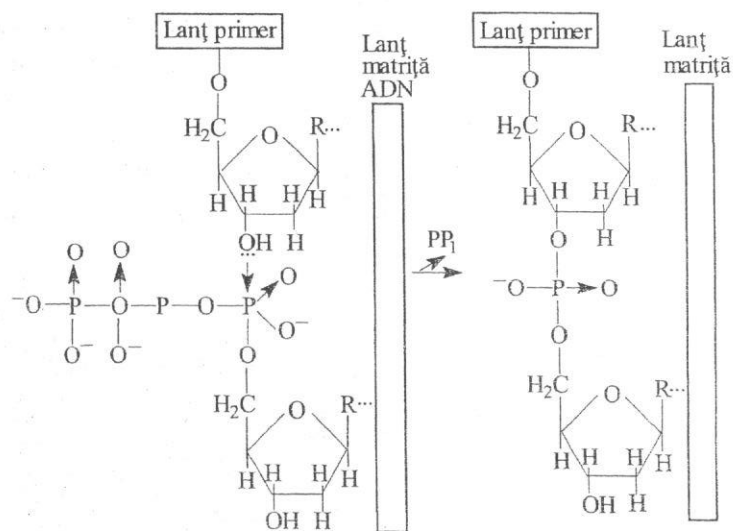


Fig.6.9. Adaosul unui dezoxiribonucleotid la cap[ătul unui primer de ADN sau ARN pe matrită de ADN prin cataliza ADN - polimerazei [4].

Prin urmare, biosinteza ADN începe cu dezasucirea celor două lanțuri din molecula de ADN parental, pe fiecare lanț se sintetizează câte un primer de ARN, ca urmare a acțiunii ARN-polimerazei și în continuarea primerului de ARN se sintetizează lanțuri de ADN complementare matritei prin acțiunea ADN-polimerazelor I, II și III.

Biosinteza ADN prezentată se referă la procariote și cu unele deosebiri, este similară și la eucariote. Replicarea ADN la eucariote este semiconservativă, ca și la procariote și are loc în intervalul dintre diviziunile celulare.

Cromozomii de la eucariote conțin histone asociate cu ADN și de aceea, se pare că mai întâi se separă de ADN și apoi începe replicarea.

Replicarea ADN la eucariote este mult mai lentă decât la procariote (0,2–2 $\mu\text{m}/\text{min}$ la eucariote față de 20–30 $\mu\text{m}/\text{min}$ la procariote), dar are loc simultan în mii de puncte. ADN-polimerazele de la eucariote sunt diferite de cele de la procariote prin structură și proprietăți fizico-chimice.

Replicarea ADN trebuie să fie precisă pentru transmiterea fidelă a informației genetice la celulele fiice. Greșelile în procesul de replicare duc la apariția unor *celule mutante*.

Celulele mutante într-o anumită limită pot fi benefice procesului de evoluție; peste un anumit nivel mutațiile fac imposibilă supraviețuirea celulelor.

R. Franklin și H.F. Wilkins (1950–1953) au studiat, cu ajutorul difracției razelor X, structura ADN ajungând la concluzia că ADN se poate obține în două forme A și B, care diferă între ele prin gradul de hidratare, forma B fiind cea importantă din punct de vedere biologic. Forma B posedă două periodicități, una principală de 0,34 nm și una secundară de 3,4 nm.

O serie de cercetători (Wilkins, 1960; Landridge și colab., 1960; Marvin, 1965) au demonstrat, pe baza difracției razelor X, posibilitatea existenței a trei forme conformaționale a ADN notate cu A, B și C, care se deosebesc printr-o serie de particularități fizice. De asemenea, Davies și Baldwin (1963) au arătat că ADN se prezintă ca o dublă elice de dreapta, cu un unghi de rotație de 45° și a numit-o forma D. În 1980, Rich și Itakura au evidențiat, prin difracția razelor X, existența unui ADN dublu helicoidal de stânga, având o formă neregulată, caracteristică conformației în zig-zag, pentru care i-au propus denumirea de ADN – z. Pentru a explica periodicitatea de 0,34 nm observată prin difracția razelor X, Watson și Crick au emis ipoteza că bazele pirimidinice și purinice sunt “stivuite” la o distanță de 0,34 nm, măsurată de la centrul uneia la centrul celeilalte. Fiecare spirală a dublului helix conține exact 10 nucleotide, ceea ce corespunde cu distanța de 34 nm

6.5.1. ADN VIRAL

Moleculele de *ADN viral* au masa moleculară mult mai mică decât ADN din celulele eucariote și se pot obține cu ușurință în formă nativă omogenă.

La unele virusuri informația genetică poate fi stocată și în molecula de ARN și în acest caz este transferată de la ARN la ADN prin procesul de transcriere inversă.

ADN este purtătorul informației genetice care se poate argumenta cu următoarele dovezi biochimice:

- Cantitatea de ADN din orice specie de celulă sau organism este constantă și nu poate fi modificată de factorii de mediu sau de schimbările în nutriția sau metabolismul celulei;
- Cantitatea de ADN pe celulă este direct proporțională cu gradul de complexitate a celulei și deci cu cantitatea de informație genetică pe care o conține (tabelul 6.4.). Bacteriile conțin aproximativ 0,01pg ($1\text{pg} = 1 \cdot 10^{-12}\text{g}$) AND pe celulă, în timp ce țesuturile animalelor superioare conțin 6 pg ADN pe celulă;

Tabelul 6.4.

Conținutul aproximativ de AND al unor celule și virusuri [2]

Specia	ADN pg/celulă sau virus	Numărul de perechi de nucleotide, milioane
Mamifere	6	5.500
Pești	2	2.000
Reptile	5	4.500
Afibieni	7	6.500
Păsări	2	2.000
Crustacee	3	2.800
Moluste	1,2	1.100
Spongieri	0,1	100
Plante	2,5	2.300
Fungi	0,02 – 0,17	20
Bacterii	0,002 – 0,06	2
Bacteriofag T ₄	0,00024	0,17
Bacteriofag λ	0,00008	0,05

- Molecula de ADN are o compoziție în baze pirimidinice și purinice diferită de la o specie la alta (tabelul 6.5.) [2];

- În aproape toate moleculele de ADN numărul resturilor de adenină este egal cu cel al resturilor de timină, iar numărul resturilor de guanină este egal cu cel al resturilor de citozină. Deci suma resturilor purinice este egală cu suma resturilor pirimidinice, $A + G = C + T$;
- Extracetele de ADN din specii apropiate au compoziții în baze pirimidinice și purinice asemănătoare. ADN din diferitele țesuturi ale aceleiași specii au aceeași compoziție în baze pirimidinice și purinice. Această compoziție dintr-o specie nu este dependentă de vârstă, condiții de nutriție și mediu.

Tabelul 6.5.

Compoziția în baze pirimidinice și purinice a AND la diferitele specii [2]

Compoziția în baze pirimidinice și purinice, % mol					Raportul bazelor		Raportul de asimetrie
	A	G	C	T	A/T	G/C	$\frac{A+T}{G+C}$
<i>Animale</i>							
Om	30,9	19,9	19,8	29,4	1,05	1,00	1,52
Ovine	29,3	21,4	21,0	28,3	1,03	1,02	1,36
Păsări	28,8	20,5	21,5	29,2	1,02	0,95	1,35
Somon	29,7	20,8	20,4	29,1	1,02	1,02	1,43
Lăcustă	29,3	20,5	20,7	29,3	1,00	1,00	1,41
<i>Plante</i>							
Germene de grâu	27,3	22,7	22,8	27,1	1,01	1,00	1,19
Drojdii	31,3	18,7	17,1	32,9	0,95	1,09	1,79
<i>Bacterii</i>							
E. coli	24,7	26,0	25,7	23,6	1,04	1,01	0,93
Staphilococcus aureus	30,8	21,0	19,0	29,2	1,05	1,11	1,50
Clostridium perfringens	36,9	14,0	12,8	36,3	1,01	1,09	2,70
Sarcina lutea	13,4	37,1	37,1	12,4	1,08	1,00	0,35
Bacteriofag T ₇	26,0	24,0	24,0	26,0	1,00	1,00	1,08
Bacteriofag λ	21,0	28,6	27,2	22,9	0,92	1,05	0,79

6.5.5. PROPRIETĂȚILE ADN ÎN SOLUȚIE

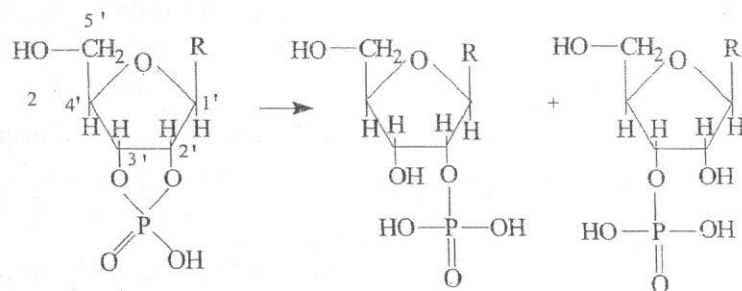
Grupările fosfat ale ADN, care formează punți între mononucleozidele adiacente, au un pK' scăzut și sunt în întregime ionizate la valori de pH mai mari de 4, ceea ce conferă moleculei de ADN un caracter puternic acid.

De grupările fosfat se leagă puternic ioni bivalenți, Ca^{2+} , Mg^{2+} , ca și amine policationice, spermina $[H_3N^+-(CH_2)_3-NH_2^+- (CH_2)_4-NH_2^+-(CH_2)_3-NH_3^+]$; spermidina $[H_3N^+-(CH_2)_3-NH_2^+-(CH_2)_4-NH_3^+]$, care la unele bacterii și virusuri sunt asociate cu molecule de ADN. Aceste asocieri conferă moleculei de ADN stabilitate și o mai mare flexibilitate.

Stabilitatea legăturilor de hidrogen între perechile de baze purinice și pirimidinice este dependentă de pH și este maximă între $pH=4$ și $pH=11$.

ADN la $pH=3$ este supus unei hidrolize blânde, când se eliberează toate bazele sale purinice fără a se afecta legăturile pirimidin-dezoxiriboză sau legăturile fosfodiesterice din catena principală. Derivatul ADN, care a fost supus hidrolizei acide și nu mai conține purine, se numește *acid apurinic*.

Alcaliile diluate nu hidrolizează ADN, însă ARN este hidrolizat datorită grupării hidroxil din poziția 2'. Hidroxidul de sodiu, în soluție diluată, hidrolizează ARN cu formarea unui amestec de nucleozid 2' și 3'-fosfați. Mai întâi se formează, la hidroliză, 2',3'-ciclic-fosfați, care apoi sunt transformați în amestecul de 2' și 3'-fosfați:



Acizii nucleici ingerați de animale sunt hidrolizați enzimatic în intestin de către nucleazele secretate de pancreas.

Punțile fosfodiesterice din ADN și ARN sunt hidrolizate de două clase de enzime: *exonucleaze* și *endonucleaze*.

Clasa exonucleazelor atacă lanțul polinucleotidic numai la capetele sale, la 3' și 5', iar endonucleazele nu necesită grupări 3' sau 5'-hidroxil libere; ele atacă anumite legături 3' sau 5' din interiorul lanțului polinucleotidic.

Dintre exonucleaze sunt bine cunoscute *fosfodiesteraza din veninul de viperă* și *fosfodiesteraza din splina de bovine*. Fosfodiesteraza din veninul de viperă hidrolizează toate legăturile 3' din ADN și ARN, eliberând aproape toate nucleotidele sub formă de nucleozid 5'-fosfați.

Enzima necesită o grupare 3'-hidroxil liberă la nucleotidul terminal și acționează în trepte, începând cu acel capăt al lanțului polinucleotidic. Fosfodiesteraza din splina de bovine hidrolizează toate legăturile 5' din ADN, și deci, eliberează numai nucleozid 3'-fosfați.

Din clasa endonucleazelor se menționează *dezoxiribonucleaza I* din pancreasul de bovine, care catalizează hidroliza unor legături 3' din ADN cu formarea unor oligonucleotide și *dezoxiribonucleaza II* izolată din splină, timus sau din diferite bacterii și hidrolizează unele legături 5'.

Soluțiile de ADN, sunt foarte vâscoase datorită rigidității dublului helix, a lungimii foarte mari a moleculei de ADN și a diametrului său mic.

Sub acțiunea unor factori fizici și chimici se produc modificări importante ale proprietăților fizice ale moleculelor de ADN când este dublu helioidal. Are loc denaturarea moleculelor de ADN când cele două catene ale dublului helix se derulează prin ruperea legăturilor necovalente și apoi se separă fără ca legăturile covalente să fie afectate. Se produce ruperea legăturilor de hidrogen dintre perechile de baze purinice și pirimidinice, precum și a interacțiunilor dintre bazele succesive.

Denaturarea moleculelor de ADN dublu helioidale se poate produce sub influența valorilor scăzute de pH, prin creșterea puternică a temperaturii mediului, descreșterea constantei dielectrice a mediului apos, sub influența alcoolilor și a cetonelor, expunerea la acțiunea ureii, amidelor etc.

Datorită denaturării, vâscozitatea soluțiilor de ADN descrește, rotația optică are valori mult mai negative, crește absorbția luminii la 280 nm.

Agenții de denaturare ai moleculelor de ADN dublu helicoidal sunt aceiași cu cei care produc denaturarea proteinelor globulare.

Denaturarea ADN dublu helicoidal este ușor reversibilă în condițiile în care efectul agentului de denaturare încetează și dacă procesul de derulare a celor două catene nu a avut loc complet și a rămas cel puțin un segment scurt dublu helicoidal, în care bazele purinice și pirimidinice au continuat să formeze perechi.

La denaturare, segmentele din molecula de ADN, cele mai puțin stabile, sunt cele mai bogate în perechi de adenină-timină, care se desfac primele.

6.6. ACIDUL RIBONUCLEIC (ARN)

Acidul ribonucleic (ARN) se găsește în celule sub forma a trei tipuri majore: ARN mesager (ARNm), ARN de transfer (ARNt) și ARN ribozomal (ARNr).

Toate cele trei tipuri de ARN sunt monocatenare și se deosebesc între ele prin masa moleculară, coeficientul de sedimentare (tabelul 6.6.) [2] și prin rolul bine definit biologic [7, 8].

Fiecare din cele trei tipuri de ARN există în forme moleculare diferite. ARNm există în sute și chiar mii de forme distincte, ARNt există în 60 de forme și ARNr există în cel puțin trei forme distincte [9, 10, 11].

Tabelul 6.6.

Unele proprietăți ale ARN din *Escherichia coli* [2].

Tipul	Coeficientul de sedimentare (S)	Masa moleculară	Numărul de resturi nucleotidice	Procent față de ARN total
ARNm	6 – 25	25000 – 1000000	75 – 3.000	2
ARNt	≈ 4	23000 – 30000	75 – 90	16
ARNr	5	≈ 35.000	≈ 100	82
	16	≈ 550.000	≈ 1500	82
	23	≈ 1.100.000	≈ 3	82

S-a arătat că acidul ribonucleic (ARN) se găsește mai ales în citoplasmă și în cantitate mică în nucleu. În citoplasmă ARN se întâlnește în formă solubilă,

cu masă moleculară mică și în formă insolubilă, cu masă moleculară mare. Forma insolubilă de ARN este localizată în ribozomi, unde este sediul sintezei proteinelor.

În acidul ribonucleic (ARN) sunt două baze pirimidinice, citozina (C) și uracilul (U), uracilul înlocuind timina (T) care se găsește în ADN și două baze purinice, adenina (A) și guanina (G) ca și în ADN.

Proporția dintre bazele purinice și pirimidinice și succesiunea lor în catenă diferă între diferitele țesuturi ale aceluiași animal, dar țesuturile similare ale unor animale diferite au o compoziție asemănătoare.

6.6.1. ACIDUL RIBONUCLEIC MESAGER (ARNm)

Moleculele de ARN care poartă informația genetică pentru biosinteza proteinelor se numesc ARN-mesager (ARNm). Celelalte două forme de ARN, care au roluri bine definite în biosinteza proteinelor, sunt așa cum s-a mai spus, ARN de transfer (ARNt) și ARN ribozomal (ARNr).

ARNt transportă la ribozomi aminoacizii într-o formă activată, pentru formarea legăturilor peptidice în secvența dictată de matrița de ARNm. Există minimum un ARNt pentru fiecare aminoacid. ARNr este o componentă a ribozomilor cu un rol în biosinteza proteinelor [12,13,14].

Acidul ribonucleic mesager (ARNm) conține numai cele patru baze majore (adenina, guanina, citozina și uracilul). El se sintetizează în nucleolele celulelor în procesul de transcripție, când secvența bazelor dintr-un lanț de ADN cromozomal este copiată enzimatic în lanțul de ARNm.

O anumită cantitate de ARNm este sintezată și în mitocondrii. După transcripție, ARNm trece în citoplasmă și apoi la ribozomi, unde are rol de matriță la ordonarea secvențială a aminoacizilor în procesul de biosinteză a proteinelor. ARNm mitocondrial este în cantitate mică, dar el se află în foarte multe forme distincte, care se deosebesc prin masa moleculară și secvența bazelor purinice și pirimidinice.

Fiecare proteină sintetizată în celulă este codificată de către un ARNm sau o secvență specifică de ARNm.

ARNm din celulele eucariote au la capătul 3' terminal o secvență de circa

200 de radicali adeninici, care se pare că are un rol în prelucrarea sau transportul ARNm de la nucleu la ribozomi [2].

ARNm este sintetizat pe matrița de ADN și are o secvență a bazelor purinice și pirimidinice complementară AND-ului matriță [15,16].

Mecanismul molecular al biosintezei ARNm pe matrița de ADN este asemănător pentru toate tipurile de ARN. Sinteza ARN pe matrița ADN este catalizată de enzima ARN-polimeraza-ADN-transcriptaza și sunt necesare următoarele componente:

- matrița AND dublu helicoidal;
- ribonucleozid-trifosfații (precursori activi: ATP, GTP, UTP, CTP);
- Mg^{2+} sau alte metale bivalente.

Sinteza ARN este în direcția $5' \rightarrow 3'$ (antiparalelă lanțului matriță de ADN), iar mecanismul de alungire a lanțului este asemănător cu a ADN, producându-se eliberarea acidului pirofosforic din ribonucleozid-trifosfat. Acidul pirofosforic este hidrolizat apoi, cu eliberare de energie (Fig.6.12.) [4].

Biosinteza ARN diferă de biosinteza ADN prin:

- matrița ADN este păstrată în sinteza ARN, fiind semiconservată numai în sinteza ADN;
- ARN – polimeraza nu necesită un primer.

6.6.2. ACIDUL RIBONUCLEIC DE TRANSFER (ARNt)

Acizii ribonucleici de transfer (ARNt) sunt molecule relativ mici și au rolul de transportori a câte unui aminoacid în procesul de biosinteză a proteinelor pe ribozomi.

Pentru fiecare aminoacid există unul sau mai mulți ARNt.

Pe lângă bazele pirimidinice și purinice, ARNt conține numeroase alte baze rare, care pot reprezenta până la 10% din total, dintre care cele mai multe sunt derivați metilați ai A, U, C, și G.. De asemenea, ARNt conține și unele nucleotide aparte, ca *acidul pseudouridilic* și *acidul ribotimidilic* (Fig.6.13.)

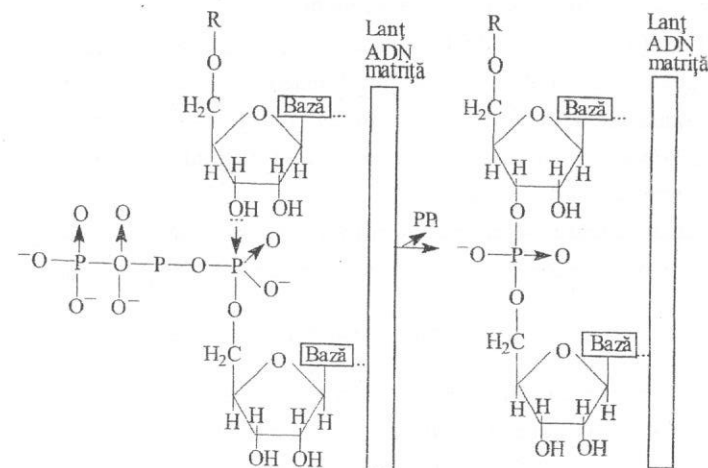


Fig.6.12. Reacție catalizată de ARN-polimerază.

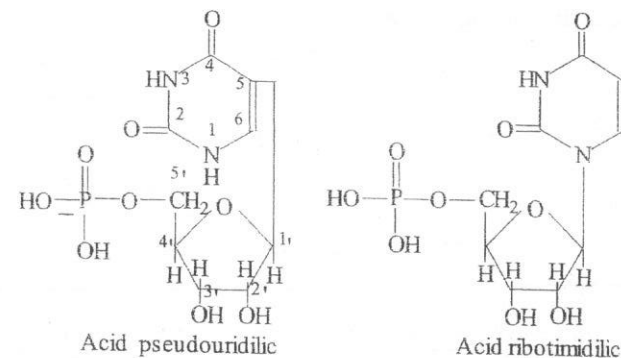


Fig.6.13. Nucleotide neobișnuite găsite în ARNt

La acidul pseudouridilic legătura dintre bază și pentoză se face în poziția 5 a uracilului și nu în poziția 1. La acidul ribotimidilic timina se află la ARN și nu la ADN cum este obișnuit.

ARN este matrița pe care se aranjează aminoacizii în secvența în care intră în lanțul polipeptidic, etapă a procesului de biosinteză a proteinelor. Dar așa cum a arătat F.H.C.Crick (1958), ARNm nu poate oferi afinitatea specifică

legării aminoacizilor, deoarece bazele purinice și pirimidinece din ARNm nu pot stabili legături de hidrogen și în consecință au o comportare hidrofobă față de cei 20 de aminoacizi care au resturi laterale foarte diferite.

Crick a sugerat că aminoacizii sunt transportați la ARNm de niște molecule adaptor care, pe de o parte, se leagă specific de câte un aminoacid și pe de altă parte, se leagă specific de ARNm.

Aceste molecule care produc racordarea aminoacizilor la ARNm s-au dovedit a fi tot specii de ARN, care s-au numit ARN de transfer (ARNt).

ARNt a fost numit de unii autori ARN solubil, ARNs, datorită solubilității sale mari în mediu acid. Fiecare moleculă de ARNt are un capăt de legare a aminoacidului și un capăt de recunoaștere a matriței de ARNm.

Locul de recunoaștere a matriței de ARNm este reprezentat de trei baze (purinice și pirimidinice) numită *anticodon*.

Anticodonul de pe ARNt recunoaște secvența complementară de trei baze (purinice și pirimidinice) din *codonul* de pe ARNm și în acest fel are loc racordarea specifică a amino-acidului de matriță. Legarea aminoacidului de ARNt este catalizată de enzime aminoacil-ARNt-sintetaze. Aminoacidul este legat prin gruparea sa carboxilică de hidroxilul din poziția 3' a ribozei de la capătul 3' al ARNt.

Toate speciile de ARNt au o structură asemănătoare: patru regiuni cu perechi de baze complementare (*tulpini*) și patru regiuni fără baze complementare (*bucle*) (Fig.6.14) [4].

Moleculele de ARNt constau dintr-un singur lanț de circa 80 nucleotide (73-90), cu masa moleculară de 25000 și un coeficient de sedimentare de 4S. Capătul 3' al lanțului de care se leagă aminoacidul transportat are secvența C-C-A (acid citidilic-acid citidilic-acid adenilic), iar capătul 5' are ca nucleotid terminal acidul guanilic fosforilat.

Gruparea 5'-hidroxil a acidului adenilic terminal este legată la gruparea 3'-hidroxil a acidului citidilic precedent printr-o punte fosfodiesterică. Gruparea hidroxil liberă din acidul adenilic terminal este acilată enzimatic cu α -aminoacidul specific, formând aminoacil-ARNt. Acest aminoacid este tran-

sferat enzimatic la capătul lanțului polipeptidic în curs de formare de la suprafața ribozomilor, în procesul de biosinteză a proteinelor [2].

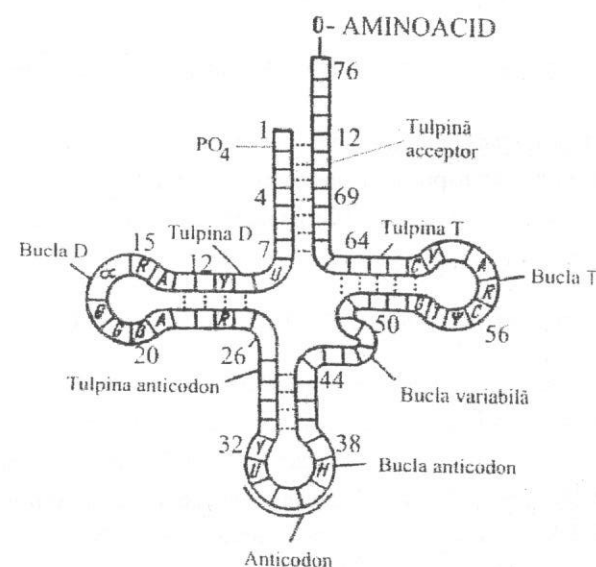


Fig. 6.14. Schița de pliere a lanțului ARNt cu formarea celor patru tulpini și patru bucle.

S-au evidențiat secvențe complementare ale nucleotidelor în anumite porțiuni ale lanțului polinucleotidic, în care se stabilesc legături de hidrogen ca și între perechile de baze din ADN. Formarea acestor legături de hidrogen determină o pliere a lanțului, ce poate fi sub formă de trifoie cu patru foi.

În Fig.6.14. există patru regiuni cu baze complementare (*tulpini*) și patru fără perechi de baze (*bucle*).

Bucle D conține dihidrouracil, bucla T conține timină, bucla a treia conține o secvență de trei baze care formează anticodonul și bucla a patra are 4-5 nucleotide și uneori mai multe, până la 21. În celelalte bucle sunt secvențe constante de nucleotide.

În tulpina acceptoare de aminoacid (Fig.6.14.), sunt 7 perechi de baze, în

tulpina T, 5, în tulpina anticodonului, 5 și în tulpina D, 4 [4].

Formarea legăturilor de hidrogen între bazele complementare din cele patru tulpini duce la structuri de dublu helix, care dă moleculei o mare stabilitate.

De remarcat că ARNt are o *formă globulară*, spre deosebire de ARNm sau ADN.

Funcția principală a ARNt este de a lega specific aminoacizii liberi din citoplasmă și de a-i transporta în ribozomi, asigurând legarea lor în lanțul polipeptidic în secvența dictată de ARNm, reacție catalizată de *aminoacil – ARNt – sintetaza*.

6.6.3. ACIDUL RIBONUCLEIC RIBOZOMAL (ARNr)

Acidul ribonucleic ribozomal (ARNr) reprezintă 65% din masa ribozomilor. În ribozomii de *Escherichia coli* (celule procariote) se găsesc sub formă de molecule liniare monocatenare, în trei forme, cu coeficienți de sedimentare de 23S, 16S și 5S și se deosebesc prin secvența și raportul bazelor.

În celulele eucariote sunt patru tipuri de ARNr, cu coeficienți de sedimentare: 28S, 18S, 7S și 5S. Deși ARNr reprezintă cea mai mare parte din ARN celular, funcția lui în ribozomi nu este bine lămurită.

6.6.4. RIBOZOMII

Ribozomii sunt particule ribonucleoproteice, esențiali în sinteza proteinelor și se găsesc în toate tipurile de celule [5]. În afară de ARN, ei nu conțin decât proteine.

Ribozomii celulelor procariote au un diametru de circa 18 nm, o masă de circa 2,8 megadaltoni și un coeficient de sedimentare de 70 S; ei conțin 60–65% ARN și 35–40% proteine. O celulă de *E. coli* conține circa 15.000 ribozomi, care reprezintă aproximativ 25% din substanța uscată a celulei [2].

Ribozomii celulelor eucariote sunt mai mari și au un diametru de 20–22 nm, o masă a particulei de 40 megadaltoni și un coeficient de sedimentare de 73–80 S. În celulele eucariote, ribozomii se găsesc și în mitocondrii și în cloroplaste.

În celulele procariote, ca și în cele eucariote, mulți ribozomi sunt asociați în șiruri numite *poliribozomi* sau *polizomi*, atașați pe o moleculă de ARNm în timpul sintezei proteice.

Ribozomii din celulele eucariote conțin molecule de ARNr mai mari și mai multe lanțuri polipeptidice decât cei din celulele procariote. Proteinele ribozomale sunt insolubile în apă la pH=7,0 și pot fi extrase selectiv, pe rând, cu soluții saline concentrate. Ribozomul prezintă locuri de legare pentru un număr de proteine ribozomale. Probabil, ARNr și diferitele tipuri de proteine, constituite din agregate moleculare pentru a forma subunități 30 S și 50 S ale ribozomului 70 S, participă la modificări conformaționale pentru a deplasa ribozomul cu lanțul său polipeptidic crescând, de-a lungul ARNm.

Ribozomii pot fi considerați ca sisteme mecano-chimice și trecuți în aceeași clasă de biostructuri ca și *actomiozina* din mușchi și microtubulul flagelilor de la eucariote [2].

Ribozomii sunt stabili în soluții de concentrații relativ mari de Mg^{2+} , iar când concentrația soluțiilor scade ribozomii se pot disocia în subunități.

6.6.5. VIRUSURILE

Virusurile, care au fost denumite „structuri de la marginea vieții”, sunt particule comune constituite, în principal, din acid nucleic și un număr de substanțe proteice specifice; ele au capacitatea de a se autoreplica atunci când intră într-o celulă gazdă specifică.

Virusurile infectează celulele animale, vegetale și bacteriene. Particulele de virus „*virioni*” au capacitatea de a se atașa la suprafața unor celule gazdă specifice și eliberează în citoplasmă acidul lor nucleic, care reprezintă partea infecțioasă a virusului.

Numeroase virusuri care parazitează plante sau animale pot fi obținute în stare cristalină fără a-și pierde virulența.

Faptul că virusurile generează procese de infecție, iar unele și de contagiune, la fel ca bacteriile patogene și faptul că posedă însușirea de a se încruși și recombina, constituie criterii pentru integrarea virusurilor în lumea organismelor vii, cu toate că nu au organizare celulară, singura capabilă să

întrețină viața.

Virusurile posedă principalele caracteristici ale vieții: metabolismul, creșterea, reproducerea și mutabilitatea, care implică și evoluția.

De asemenea, particula virală prezintă complexitate morfologică și fiziologică, probabilitatea existenței la unele virusuri a unei formații nucleare simple și mai ales prezența acizilor nucleici, care constituie izvorul proceselor vitale. Toate acestea duc la concluzia că virusurile pot fi considerate cele mai simple forme de viață [3].

Virusurile sunt foarte variate în ceea ce privește greutatea, forma și compoziția chimică (tabelul 6.7.) [2].

Tabelul 7.7.

Caracteristici ale unor virusi

	Greutatea Virusului (megadaltoni)	Acizii nucleici	Număr de lanțuri	Acid nucleic (%)	Forma	Axa mare (nm)
<i>Virusurile bacterelor (Bacteriofagi)</i>						
T ₂ , T ₄ , T ₆	≈220	ADN	2	61	Mormoloc	18
T ₇	38	ADN	2	41	Mormoloc	6
φ N 174	6	ADN	1 sau 2	26	Poliedral	15
λ	50	ADN	2	64	Mormoloc	20
M 52	3,6	ARN	1	32	Poliedral	17,5
<i>Virusuri vegetale</i>						
Mozaicul tutunului	40	ARN	1	5	Bară	300
Virus al tomatelor	10,6	ARN	1	15	Poliedral	28
Necroza tutunului	1,97	ARN	1	20	Poliedral	21

Spre deosebire de celule, virusurile conțin numai ADN sau numai ARN.

ADN din virusurile care conțin ADN, după ce a intrat în celula gazdă, servește ca matriță pentru transcripția moleculelor complementare de ARNm, care vor determina aparatul ribozomal al gazdei să sintetizeze proteine virale și enzimele necesare pentru sinteza ADN viral.

ARN din virusurile care conțin ARN, se leagă de ribozomii gazdei în detrimentul ARNm gazdă și funcționează ca matriță pentru sinteza proteinelor

virale și a enzimelor necesare pentru replicarea ARN viral. În unele cazuri, ARN viral determină sinteza unui ADN care codifică sinteza unor proteine virale [2].

6.7. ACȚIUNEA ȘI INTERACȚIUNEA GENELOR

Trăsăturile fundamentale ale ființelor vii sunt organizarea celulară, metabolismul, autoconservarea, reactivitatea, creșterea, reproducerea, mutabilitatea și evoluția. Fac excepție de la organizarea celulară virusurile, care au o organizare necelulară, adeseori sunt lipsite de membrană; la majoritatea virusurilor este imposibil de pus în evidență existența nucleului și au dimensiuni foarte mici (10–500 mμ) [4].

Toate celulele, de la celulele specializate ale organismului, incluzând acelea ale pielii, mușchilor, oaselor, din ficat și creier derivă de la copia identică a singurei celule ou fertilizate.

Fiecare din aceste celule au exact același ADN ca și celula originală, chiar dacă au mari diferențe la înfățișare și funcții.

Genele dictează cum se specializează aceste celule.

S-au dezvoltat o serie de metode biochimice și genetice în care ADN poate fi separat, rearanjat și transferat de la o celulă la alta. Unele din aceste metode de laborator servesc și la studiul proprietăților genelor.

Moleculele de ADN de la toate formele de viață au aceeași structură și aceleași patru baze (purinice și pirimidinice). Pe baza acestor analogii, una sau mai multe gene dintr-un organism s-au introdus în al doilea organism. Noile gene, uneori numite *ADN străin*, ajung funcționale în organismul secund și produc proteinele dorite. Se folosește așa numitul *ADN recombinant* pentru a se obține, de exemplu, o cantitate mare de proteine asemenea insulinei.

Primul pas în crearea insulinei utilizând ADN recombinant este izolarea secvenței de nucleotide din ADN al celulei umane care formează genele pentru insulină. Se folosesc enzime specifice cu care se scindează lanțul dublu de ADN în punctul în care genele de insulină acționează.

ADN-ul izolat poate fi recombinat sau îmbinat cap la cap cu un vector, fragment de ADN, care este capabil să transporte genele de la un organism la altul.

Vector poate fi un *plasmid*, mici fragmente circulare de ADN ce se găsesc în bacterii, bacteriofagi, virusuri, care sunt paraziți ai bacteriilor. Introducând vectorul, care conține genele insulinei, în bacterii, asemenea E.coli, în cinci ore o singură E.coli reproduce sute de copii a genelor producătoare de insulină. Acest proces duce la crearea multor celule cu ADN identice cu cel introdus.

Plasmidul, constă din molecule în formă de spirală de ADN în afara cromozomilor. El este prezent în aproape toate bacteriile și poate, de asemenea, fi găsit în fungi, protozoare, chiar în unele plante și animale. Plasmidele au mai puține gene decât ADN-ul din cromozomi.

Caracteristicile de bază ale ființelor vii sunt condiționate de materialul genetic localizat în cromozomi.

La procariote (virusuri, alge albastre) se întâlnește, de obicei, un singur cromozom, care poartă denumirea de *genoform*. Genoformul are o structură foarte simplă, se găsește într-o capsulă numită *nucleoid*, fără membrană și diviziunea acestuia se face vegetativ prin schizotomie.

La eucariote, cromozomii sunt situați în nucleul celular, au o structură complexă, se găsesc cel puțin doi și sunt supuși diviziunii mitotice și meiotice.

Componenta chimică de bază a cromozomilor de la eucariote și procariote este acidul dezoxiribonucleic (ADN) care constituie materialul genetic. La numeroase virusuri ADN este înlocuit cu acidul ribonucleic (ARN).

ADN cromozomal constituie substratul material al eredității. El guvernează activitățile specifice ale celulei și participă direct la biosinteza proteinelor. Prin secvența specifică a nucleozidelor, ADN cuprinde întreaga cantitate de informație genetică (mesajul genetic) prin care se transmit caracterele unui individ.

Transferarea informației genetice de la ADN la sinteza proteinelor și la realizarea caracterelor, are loc prin intermediul următoarelor procese: *autoreplicarea moleculei de ADN*, *transcripția genetică* și *translația genetică*.

Autoreplicarea moleculei de ADN se face prin separarea celor două catene și formarea de catene complementare, așa cum s-a arătat mai sus.

Sinteza ADN cuprinde următoarele procese: formarea dezoxiribonucleozidelor, transformarea acestora în dezoxiribonucleotizi trifosfați, unirea dezoxiribonucleotizilor trifosfați prin legături de hidrogen cu dezoxiribonucleotizii din catena de ADN care servește ca matriță, formarea de legături 3',5'-monofosfodiesterice între dezoxiribonucleotizii succesivi în prezența ADN-poli-merazei [3].

Transcripția genetică sau *transferarea mesajului genetic* din moleculele de ADN în moleculele de ARN se realizează printr-un proces de heterocataliză, în care ARN-poli-meraza servește ca enzimă activantă, iar una din catenele de ADN îndeplinește funcția de matriță pentru sinteza de structuri monocatenare de ARN complementare catenei de ADN care a servit ca tipar. ARN sintetizat se numește ARN mesager (ARNm).

Acesta înmagazinează mesajul genetic din ADN și servește la rândul său ca matriță pentru sinteza proteinelor. ADN servește ca matriță și pentru sinteza ARNt și ARNr.

Translația genetică reprezintă traducerea mesajului genetic cuprins în moleculele de ARNm într-o secvență de acizi aminici, formarea legăturilor peptidice, a polipeptidelor și în final, sinteza proteinelor. În acest proces complex mai participă ARNt, ARNr și o serie de enzime activatoare.

La virusurile care nu au în constituția lor ADN, informația genetică este înmagazinată în ARN viral, care este monocatenar ca și ARN celular. Autoreplicarea acestuia se face pe baza unei matrițe proprii și nu pe baza unei matrițe de ADN ca în cazul ARN celular.

ARN viral îndeplinește funcția de sinteză a proteinelor, cât și cea de transmitere a informației genetice de la o generație la alta. Unitățile din molecula de ADN sau din ARN viral, care conțin materialul genetic și deci reprezintă suportul material al informației genetice sunt *genele*.

Gena este unitatea elementară a eredității și este o unitate funcțională din molecula de ADN sau ARN viral, formată dintr-o succesiune anumită de nucleotide care determină sinteza unei anumite proteine.

Genele apărute prin modificarea *genelor normale*, care de regulă sunt predominante, se numesc *gene mutante*. Ca rezultat al procesului de mutație, una și aceeași genă poate apărea sub mai multe forme, cunoscute sub denumirea de *alele*. În cazul când gena a suferit mai multe procese mutaționale se formează așa zisele *gene polialele*.

Pentru a evalua materialul genetic, se menționează numai că în nucleul eucariotelor se găsesc cel puțin doi cromozomi și un cromozom conține mai multe molecule de ADN, iar o moleculă de ADN conține mai multe gene și o genă are circa 500–2000 de subunități de recombinare (*reconi*) sau subunități de mutație (*mutoni*).

Cum unele cercetări arată că un recon, respectiv un muton, poate avea un număr mai mare de perechi de nucleotide, de exemplu, 2 la bacteriofagul T₄, 10 la *Escherichia coli*, 100 la *Neurospora*, reiese că numărul perechilor de nucleotide dintr-o genă este de ordinul zecilor de mii și chiar sutelor de mii.

Din punct de vedere structural, gena poate fi subdivizată până la nivelul nucleotidei, dar din punct de vedere funcțional gena constituie o unitate bine definită [3].

Genele sunt centre de activitate biologică situate liniar de-a lungul macromoleculi de ADN, care controlează toate reacțiile biochimice și procesele fiziologice din organism și implicit formarea caracterelor individuale. Având capacitatea de autoreproducere fidelă, genele asigură stabilitatea înșușirilor nenumerate forme de plante și animale și perpetuarea acestora de-a lungul miilor de generații.

Organizarea structurală a macromoleculor de ADN și deci a genelor, reprezintă forma cea mai înaltă de organizare a materiei vii. Principalele înșușiri ale ființelor vii sunt codificate în gene și poartă amprenta acțiunii acestora. În numeroase cazuri genele acționează asupra *fenotipului*, care este ansamblul de proprietăți și de caractere acumulate în procesul dezvoltării individuale a organismului, în strânsă legătură cu alte gene.

Genele constituie substratul material al vieții, fiind generatoare ale tuturor fenomenelor vitale. Acestea transmit înșușirile fundamentale ale materiei vii precum și caracterele individuale.

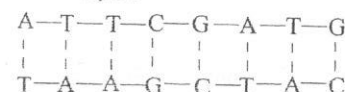
Genele constituie izvorul vieții și asigură permanentizarea acestora în cursul dezvoltării speciilor [3].

Genă poate fi definită ca un segment al macromoleculi de ADN sau ARN, în cazul unor virusuri, format dintr-o secvență anumită de nucleotide, care acționează ca o unitate funcțională și care conține informația genetică ce determină secvența nucleotidelor într-o moleculă de ARNm (transcripția genetică) și respectiv, a aminoacizilor într-o catenă polipeptidică (translația genetică).

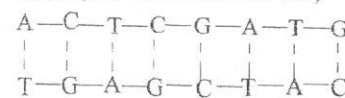
Genomul este ansamblul de gene ce se găsesc în cromozomii unei specii.

Genomul uman este compus din 50000–100000 de gene localizate în 23 de perechi de cromozomi dintr-o celulă umană. Un singur cromozom poate conține mai mult de 250 milioane de ADN și se estimează că întregul genom uman constă din 3 miliarde de ADN.

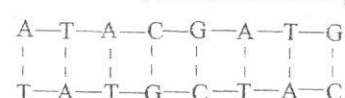
Genă inițială



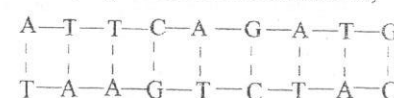
Tranziție (TA înlocuit cu CG)



Transversie (TA înlocuit cu AT)



Insertie (perechea AT este inserată)



Deleție (GC este eliminată)

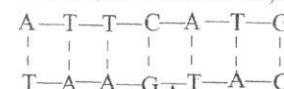


Fig.6.15. Tipuri de mutații punctiforme [2].

S. Benzer a dovedit că fiecare genă conține mai multe situri mutabile. Mutația poate implica o schimbare chimică într-un singur nucleotid (mutația punctiformă).

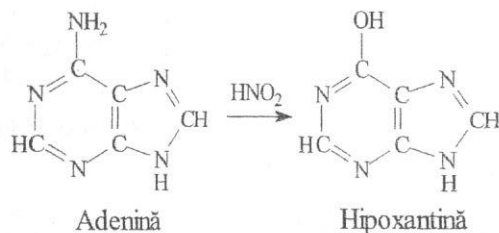
Au fost identificate mai multe tipuri de transformări chimice, care conduc la produși ai genei mutante.

Pe baza transformărilor produse în ADN sub acțiunea unui agent mutagen, mutațiile punctiforme se pot clasifica în patru tipuri (Fig.6.15) [2]:

- mutații tranziționale;
- mutații prin transversie;
- mutații prin inserție;
- mutații prin deleție.

Mutațiile tranziționale implică înlocuirea unei perechi de baze purinice și pirimidinice cu o altă pereche, astfel încât o bază purinică, respectiv pirimidinică dintr-o catenă să fie schimbată cu o altă bază purinică, respectiv pirimidinică din cealaltă catenă [2]. Mutațiile tranziționale se produc spontan, dar pot fi induse și prin intermediul bazelor analoage, de exemplu, 5-bromuracilul și 2-aminopurina.

Deoarece 5-bromuracilul are o structură foarte apropiată de a timinei, el este înserat în cursul replicării ADN ca acid 5-bromuracil, în poziția ocupată normal de timină. 2-amino-purina acționează în mod similar; ea poate fi citită fie ca adenină (A), fie ca guanină (G). Mutațiile tranziționale pot fi produse și de acidul azotos, care prin dezaminarea adeninei formează hipoxantina.



În *mutațiile prin transversie*, o pereche de baze purină-pirimidină este înlocuită cu una pirimidină-purină.

Inserția, un alt tip de mutație punctiformă, implică introducerea unei perechi de baze purinice și pirimidinice suplimentare, care are ca rezultat schimbarea codului de citire al informației genetice.

Un alt tip de mutație rezultă prin *deleția* uneia sau mai multor baze purinice și pirimidinice din AND, care duce la schimbarea codului de citire al informației genetice.

O deleție se poate produce prin îndepărtarea hidrolitică a unei baze purinice, prin acțiunea unor agenți de alchilare sau dezaminare, având ca rezultat formarea unei baze nepereche.

Mutații se pot produce și prin acțiunea unor agenți chimici, ca acidul dietilamidolisergic sau cofeina. Radiațiile γ și X, razele ultraviolete sunt agenți mutanți. Prin iradiere cu ultraviolete se formează *dimeri de timină*, în care două resturi de timină adiacente sunt legate covalent prin ciclobutan (Fig.6.16.) [2].

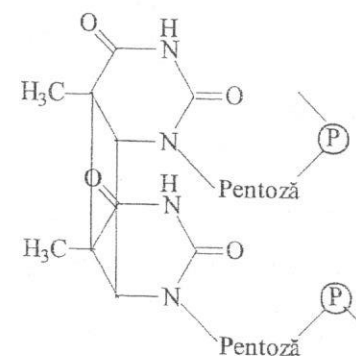


Fig.6.16. Structura dimerului de timină

6.7.1. REGLAREA ACTIVITĂȚII GENELOR

Celulele posedă mecanisme precise pentru reglarea cantităților relative a diferitelor proteine sintetizate.

E. coli are gene pentru circa 3000 de proteine diferite. O celulă din *E. coli* conține circa 15000 de ribozomi, ceea ce înseamnă că fiecare proteină din cele 50 sau mai multe proteine ribozomale este prezentă în circa 15000 copii [2]. Dacă unele proteine sunt sintetizate în număr exact și constant, altele, cum sunt cele ale căii glicolitice, sunt prezente într-o concentrație care variază în funcție de disponibilitățile de materiale nutritive din mediu.

Reglarea vitezei de sinteză a enzimelor este în funcție de necesarul fiecărui tip de celule pentru desfășurarea activităților lor fundamentale și face posibilă o economisire în utilizarea aminoacizilor la sinteza enzimelor, care sunt folosite după necesități.

În organismele superioare sunt diferite tipuri de celule, diferențiate prin structură, compoziție moleculară și funcții biologice caracteristice. Aceste diferențieri sunt determinate, în parte, de sinteza unor seturi de enzime distincte. Biosinteza diferitelor tipuri de proteine, în astfel de celule, este programată cu strictețe.

În literatură, s-au publicat rezultatele cercetărilor de genetică și de biochimie referitoare la procesul de reglare a sintezei proteice la procariote. Reglarea exprimării genelor la eucariote este un proces mai complex decât la procariote, care este în continuare în atenția cercetătorilor.

Cercetările privind sinteza celulară a enzimelor au dus la descoperirea fenomenelor de *inducție* și de *represie enzimatică*, fenomene opuse ca acțiune și care controlează cantitatea de substanță sintetizată.

Inducția enzimatică este procesul de producere în celule a enzimelor necesare metabolizării unor substanțe care obișnuit nu sunt prezente în mediu. Inducția enzimatică este reglată genetic, realizându-se o adaptare enzimatică a organismelor, în care este posibil să se utilizeze medii variate.

Un exemplu de inducție enzimatică îl constituie concluziile cercetărilor lui F.Dienert referitoare la drojdia de bere (*Saccharomices cerevisiae*), care poate fermenta lactoza din lapte cu ajutorul *lactazei*.

Tulpinele de drojdie de bere crescute, mai multe generații, pe un mediu ce a conținut lactoză au o cantitate mare de lactază, astfel că ele încep fermentația la aproximativ o oră de incubație. În cazul tulpinilor care nu au fost crescute în mediu de lactoză fermentația nu are loc din cauza lipsei lactazei. Totuși, în mediu cu lactoză, fermentația începe după circa 14 ore de incubație, ceea ce arată că prezența lactozei induce producerea lactazei de către celulele de drojdie [5].

Inducția enzimatică se produce datorită prezenței în mediu a *inductorului*, substanță ce trebuie metabolizată.

Represia enzimatică este un proces opus inducției enzimatică, prin care este inhibată sinteza proteică datorită unui *represor*.

Pe baza celor prezentate, privind inducția și represia enzimatică, proteinele și enzimele se pot grupa în:

- enzime constitutive și proteine constitutive sintetizate în cantități constante, cu viteză constantă indiferent de starea organismului, indiferent de prezența sau absența substratului, datorită activității unor gene constitutive;
- enzime adaptive produse numai când sunt necesare pentru metabolizarea unor constituienți ai mediului.

F.Jacob și J.Monod au presupus existența unor gene reglatoare care determină sinteza unor represori, proteine citoplasmice, ce au rolul de a permite sau a împiedica alte gene să realizeze sinteza enzimatică.

Moleculele represorilor pot fi inactivate dacă sunt combinate cu moleculele mici de inductori (de exemplu, lactoză) sau pot fi activate dacă sunt combinate cu molecule de corepresori (de exemplu, histidina).

După funcția lor, genele sunt grupate în *gene structurale*, *gene reglatoare* și *gene operatoare*. Genele structurale codifică diferite proteine cu rol structural sau enzimatic. Genele operatoare declanșează sau nu activitatea genelor structurale, iar genele reglatoare controlează sau dirijează activitatea genelor operatoare sau a genelor structurale.

Genele structurale afectează fiecare o enzimă, conform principiului *o genă – o enzimă* și sunt funcțional independente.

Genele reglatoare nu funcționează pe principiul *o genă – o enzimă*, ele au rolul de a regla sinteza mai multor enzime.

Represorii pot controla sinteza mai multor enzime prin intermediul unei regiuni cromozomale adiacente denumită *operator*. Genele aflate sub controlul unui singur represor alcătuiesc un *operon*.

Operonul este ansamblul format din mai multe subunități, *operatorul*, *genele structurale*, *promotorul* și *gena operatoare*, care alcătuiesc împreună un segment cromozomial. El poate fi "citit" de ARNm de la un cap la altul al moleculei de ADN într-un anumit sens (F.Jacob, J. Monod).

Operatorul este un segment de ADN, plasat pe cromozom alături de genele structurale; are o genă operatoare adiacentă genelor structurale, care are posibilitatea de a se combina sau nu cu represorul, inducând sau blocând funcționarea genelor structurale. Gena operatoare are rolul de a recepționa semnalele emise de genele reglatoare și de a acționa asupra genelor structurale.

Promotorul constituie locul de inițiere a sintezei ARNm și este elementul care limitează nivelul maxim al transcrierii mesajului.

Genele structurale sunt tot un segment de ADN și controlează producerea unor substanțe cu rol structural sau enzimatic.

Într-o zonă a cromozomului se află genele reglatoare ale operonului a cărui produs este represorul, care este eliberat în citoplasmă și se fixează pe operator în mod specific.

Genele reglatoare acționează asupra mai multor gene structurale. Ele realizează reglajul sintezei enzimelor prin intermediul unui represor, care se opune transferului de informație genetică de la genele structurale la locul de sinteză a enzimelor [2].

Transcrierea mesajului începe cu promotorul aflat înaintea genelor structurale, se produc moleculele de ARNm ce conțin transcrisă informația genetică a mai multor gene structurale adiacente din operon.

Genele structurale din ADN nu pot produce adaptarea activității de biosinteză celulară la nevoile de moment. De aceea, în celulă există genele reglatoare, plasate în altă parte pe cromozom, care determină sau inhibă activitatea genelor structurale, astfel că în celulă se produce sinteza enzimelor strict necesare activității metabolice la un anumit moment și în cantitatea necesară.

Din cele prezentate mai sus, rezultă că:

- Genele sunt localizate în cromozomi, sunt particule materiale aranjate liniar de-a lungul cromozomului și fiecare genă ocupă un loc bine definit, numit „*locus*”;
- Gena are următoarele caracteristici de bază: este unitate funcțională în sensul că determină caracteristicile ereditare, este unitate mutațională, adică structura chimică a genei se schimbă prin mutație, ceea ce duce la apariția

caracterului nou și este unitate de recombinare, adică poate avea loc schimb de gene între cromatidele nesurori ale cromozomilor omologi;

- Gena stabilește ordinea aminoacizilor în molecula proteică. Fiecare genă controlează sinteza și funcționarea unei anumite enzime;
- Fiecare genă este alcătuită din aproximativ 900–1500 de nucleotide, din lanțul ADN sau ARN viral, dispuse liniar;
- Gena este definită ca un segment de ADN sau ARN viral care conține informația genetică necesară sintezei unei catene polipeptidice;
- Gena este alcătuită dintr-o secvență de codoni care codifică succesiunea aminoacizilor într-o catenă polipeptidică;
- Conform concepției „o genă – o catenă polipeptidică”, unele proteine sunt sintetizate pe baza informației genetice din două sau mai multe gene;
- În cadrul genei pot avea loc recombinații și mutații;
- Sunt gene structurale și reglatoare: genele structurale codifică sinteza proteinelor, iar genele reglatoare controlează și dirijează acțiunea genelor structurale;
- Există mecanisme ale reglării activității genelor care diferă la procariote de cele de la eucariote.

La procariote, genomul bacterian este alcătuit din gene esențiale localizate în cromozomul bacterian și gene accesorii localizate în afara cromozomului bacterian.

Genomul bacterian este reprezentat printr-un număr restrâns de gene (de exemplu, *E.coli* are circa 4000 de gene) și conține un singur grup de legătură. Transmiterea caracterelor ereditare, la procariote, diferă de cea de la eucariote, deoarece lipsește procesul clasic al reproducerii sexuale.

La eucariote, materialul genetic are o organizare mult mai complexă. Moleculele liniare de ADN dublu catenare formează complexe cu proteinele histonice, alcătuind fibra elementară nucleohistonice (nucleozomală).

Aceste substanțe, complexându-se cu ARN și cu proteinele nehistonice, formează cromatina, materialul prin care se diferențiază în procesul de diviziune, cromozomii.

6.8. MĂSURAREA CONCENTRAȚIEI ȘI PURITĂȚII ACIZILOR NUCLEICI

6.8.1. METODE OPTICE

ADN și ARN absorb razele ultraviolete foarte puternic, iar absorbția optică poate fi folosită cu exactitate, rapid și nedestructiv la măsurarea concentrației chiar și atunci când aceasta este foarte mică (de exemplu, 2,5 μg/ml) [6].

O foarte utilă aproximație a acestei absorbții este și a amestecului de ADN și ARN în soluție apoasă.

Absorbția razelor ultraviolete, în cele mai multe cazuri, se folosește pentru estimarea purității relative a diferitelor preparate de acizi nucleici. Este o metodă rapidă, ușor de realizat și nu reclamă denaturarea ADN sau ARN. Spectrul relevant este între 230 și 320 nm. Absorbția la 320 nm este mult mai mare decât la 260 nm și indică prezența substanțelor străine nedorite.

6.8.2. METODA FLUORESCENȚEI

Fluorescența bromurii de ethidium crește de aproximativ 50 de ori când se interpune ADN. Când fluorescența este provocată de razele ultraviolete și emisiunea este în spectrul vizibil, se pot utiliza metode foarte simple de evidențiere a ADN.

Mai mult, cuantumul ridicat produce o sensibilizare avansată. Se poate detecta prin metoda fluorescenței, în determinări cantitative, până la 2,5 ng de ADN, dar spre deosebire de absorbția în UV se produce degradarea ADN. Cu ajutorul fluorometrului, se poate determina cantitativ ADN, pe seama creșterii fluorescenței bromurii de etidiu, în prezența ADN. Astfel, 20 μl soluție tampon (0,01 M Tris-HCl, pH=7,4, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA și 1 μg/ml bromură de etidiu) se etalează pe suprafața transiluminatorului de lungimi de undă scurte UV(260 nm) (Mineralight, Ultraviolet Products, Inc., San Gargiel, Calif.).

Se adaugă 5 μl din soluția standard de ADN (10 μg/ml), se amestecă bine și se citește la spectrofotometru. Se face o serie de cinci diluții, din soluția standard de ADN, pentru a se trasa curba etalon pe baza căreia se determină con-

centrația soluției de analizat.

6.9. PĂSTRAREA ADN

Cu precauții specifice, ADN pur poate fi păstrat o perioadă lungă de timp cu o mică degradare. Păstrând la 4°C în 10 mM Tris, pH = 8,0, 1 mM EDTA se produc degradări neînsemnate, doar o singură scindare la 3.10⁵ perechi de baze purinice și pirimidinice dintr-o structură de ADN.

Se utilizează pH=8 deoarece rata dezaminării ADN este mai redusă decât la păstrarea la pH=7. Prezența EDTA îndepărtează cationii divalenți liberi care favorizează activitatea celor mai multe nucleaze. EDTA inhibă, de asemenea, dezvoltarea microorganismelor care pot sintetiza mari cantități de nucleaze.

6.10. PURIFICAREA ADN

Preparatele de ADN sunt frecvent contaminate cu substanțe care inhibă enzimele, degradează ADN sau cauzează o proporție artificială de migrare a ADN în geluri. În unele cazuri pot fi utilizate metode simple pentru înlăturarea unor astfel de situații, cum ar fi extracția cu fenol urmată de o precipitare cu etanol. O problemă specifică a preparatelor de ADN din celulele eucariote este prezența carbohidraților cu greutate moleculară înaltă. Aceștia pot inhiba reacțiile enzimatice, dar pot fi eliminați prin centrifugare.

Purificarea ADN se face și pe coloana cromatografică cu DEAE- celuloză sau hidroxiapatită. În aceste metode cromatografice ADN este legat selectiv în materialul din coloană. Contaminanții sunt spălați și apoi ADN eluat. Se pot utiliza soluții de ADN foarte diluate, dar și soluții concentrate.

6.11. PRECIPITAREA ADN

Precipitarea ADN cu etanol este metoda standard pentru concentrarea ADN. Această metodă se poate aplica și la precipitarea ADN în cantități mici de ordinul nonagramelor din soluții păstrate în sticlărie siliconizată sau vase de plastic.

Precipitarea cu acid tricloracetic este utilizată la separarea acizilor nucleici oligomeri radioactivi de nucleotide și nucleozide radioactive. Se procedează la precipitarea oligomerilor și la colectarea lor pe filtru. Oligonucleotidele care conțin 10–20 de nucleotide sunt reținute și ele pe filtru.

Precipitarea și fracționarea după mărime a ADN cu polietilen glicol. Poli-etilenglicolul precipită ADN aproape cantitativ cu condiția ca concentrația inițială a ADN să fie mai mare de 50 μg/ml. Nu degradează ADN.

Precipitarea cu polietilen glicol poate fi selectivă pentru diferitele mărimi de molecule de ADN, utilizând diferite concentrații de polietilen glicol. O astfel de metodă poate fi folosită, de asemenea, la separarea ADN plasmatic de ADN cromozomal.

6.12. IZOLAREA ADN DIN ESCHERICHIA COLI

Izolarea ADN din *Escherichia Coli* pune relativ puține probleme. Se obține un ADN foarte pur, cu o valoare medie a mărimii fragmentelor mai mare de 10 kb. Exemplul de mai jos de obținere a ADN din *E. Coli* este o metodă modificată a cercetătorilor Sato și Miura (1963).

Toate operațiile cu ADN au loc la 0°C.

Creșterea celulelor se face staționar, peste noapte, în 5 ml de mediu YT [1.000 ml apă distilată, 5 g NaCl, 8–10 g YT (Bactotryptone), 5 g extract fermentativ]. Se centrifughează 3x1,5 ml de celule în centrifuga Eppendorf. Se resuspendă pastilele de celule rezultate de la centrifugare, în 15 μl soluție de lizozime (proaspăt dizolvată, la concentrația de 2 mg/ml în 0,15 M NaCl, 0,1M EDTA, la pH = 8). Se supune incubăției, la 37°C pentru 10–20 min, până ce are loc liza la celule.

Liza este indicată de creșterea vâscozității.

Se imobilizează în gheață de etanol uscată.

La celulele congelate se adaugă 125 μl soluție tampon formată din: 1% SDS, 0,1% M NaCl, 0,1 M Tris – HCl, pH = 9. După adăugare, se agită pentru ca celulele să se dezghețe. Se adaugă 150 μl soluție tampon, menționată mai sus, saturată cu fenol și apoi se agită. Urmează o centrifugare de 3 min la centrifuga Eppendorf.

Se separă faza superioară apoasă care conține ADN și se adaugă 300 μl etanol de 95%. Se agită, se imobilizează în gheață la –20 sau –70°C, pentru 30 min, și se centrifughează timp de 5 min.

Se resuspendă pastilele de ADN rezultate de la centrifugare în 100 μl de soluție tampon de 0,1x SSC [175 g NaCl, 88 g citrat de sodiu, 1000 ml apă distilată, care se aduce la pH = 7 cu aproximativ 1 ml HCl concentrat].

Se produce dizolvarea ADN, apoi se adaugă 5 μl soluție tampon SSC. Se adaugă 4 μl RNase TI (Sigma, R8521) cu 0,8 mg/ml și 3 μl RNase A (Sigma, R4875) cu 2 mg/ml și se incubă la 37°C timp de 30 min.

Se adaugă 100 μl SSC saturat cu fenol, se agită și se centrifughează 3 min. apoi se separă stratul apos și se precipită ADN în etanol.

6.13. IZOLAREA PLASMID ADN

Plasmidele sunt elemente genetice extracromozomale ale celulelor din aproape toate bacteriile și pot fi, de asemenea, găsite în fungi, protozoare și chiar în unele plante și animale.

Plasmidele sunt molecule ADN circulare, se reproduc singure, separat de cromozomi, prin diviziune celulară succesivă; ele includ factorul F și factorul R. Plasmidele pot deveni integrate în cromozomi și uneori sunt denumite „*episomes plasmin*”, enzime proteolitice cu mare specificitate pentru fibrină și au abilitatea deosebită de dizolvare formând fibrină sub formă de ghem.

Plasmidele sunt un instrument important utilizat în ingineria genetică și, de asemenea, sunt o cale de a înțelege cum cauzează bacteriile bolile la om.

Plasmidele au, în general, mai puține gene decât ADN din cromozomi. Unele plasmide ajută bacteriile de a face uz de surse de hrană neuzuale, cum sunt camforul sau petrolul.

Plasmidele permit bacteriilor să degradeze sau să inactiveze antibioticele utilizate la stoparea creșterii bacteriene sau să supraviețuiască în prezența metalelor grele, convertind aceste metale într-o formă lipsită de toxicitate. Alte plasmide permit unor bacterii de a produce compuși chimici toxici pentru alte organisme cum ar fi: insectele, oamenii și unele bacterii.

Unele bacterii au plasmide cunoscute ca *plasmide virulente*, care au caracter toxic și sunt dăunătoare omului.

Un procedeu utilizat frecvent de izolare a plasmid ADN se desfășoară în patru etape:

1. creșterea numărului de copii de plasmide pe celulă;
2. purificarea plasmidelor din cele mai multe materiale bacteriene;
3. separarea plasmid ADN superrăsucite de alte ADN și de cele mai multe sfărâmături bacteriene rămase;
4. îndepărtarea materialului de contaminare cu greutate moleculară mică prin filtrare pe gel.

După modul lor de replicare, plasmidele pot fi împărțite în două clase.

Cel mai util pentru manipulările ingineriei genetice este controlul replicării relaxate a ADN. Plasmidele din această clasă, în contrast cu ADN-ul bacterian gazdă, nu necesită continuarea sintezei proteice pentru această replicare. De aceea, în prima etapă a procedurii izolării plasmidelor, bioreacția poate fi amplificată selectiv prin adăugarea inhibitorilor de sinteză a proteinelor în cultura bacteriană. În practică, aceștia au ca urmare creșteri de 10–20 de ori în beneficiul plasmidelor.

A doua etapă a acestui procedeu este liza blândă a bacteriei în combinație cu tensioactivi slabi.

Centrifugarea, îndeajuns de energetică, formează un precipitat care conține cel mai mult ADN crozomal al gazdei bacteriene, cele mai multe membrane și alte structuri mari. Plasmidul ADN și alte molecule mici se găsesc în supernatant.

În a treia etapă, se adaugă bromura de etidiu și CsCl la supernatant și soluția rezultată se centrifughează într-o ultracentrifugă. Bromura de etidiu se intercalează între bazele din helixul ADN, reducând densitatea helixului.

În etapa a patra are loc o filtrare pe gel pentru îndepărtarea substanțelor contaminante cu greutate moleculară mică.

Dintre metodele de analiză a acizilor nucleici, se menționează analiza cu raze X, determinarea constantei de sedimentare prin ultracentrifugare, metoda

cu izotopi radioactivi, metode cromatografice folosite la izolarea, purificarea și caracterizarea diferitelor tipuri de acizi nucleici (cromatografia de adsorbție pe amidon, cărbune, kiselgur, geluri de fosfat de calciu, albumină metilată, cromatografia pe rășini schimbătoare de ioni, cromatografia pe hârtie și cromatografia în strat subțire).

Purinele și pirimidinele, ca și nucleozidele și nucleotidele se pot analiza calitativ și cantitativ aproape exclusiv pe cale cromatografică.

Pentru separarea bazelor purinice și pirimidinice se folosesc: cromatografia pe coloană cu schimbători de ioni, cromatografia pe hârtie și cromatografia în strat subțire.

Aceste metode se aplică la diferite amestecuri de virusuri, bacterii, levuri, țesuturi vegetale și animale.

Bibliografie selectivă

1. Nenițescu C. D., *Chimie organică*, Vol. II, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980
2. Leninger A.L., *Biochimie*, Vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1987, 1992
3. Ceapoiu N., *Genetica și evoluția populațiilor biologice*, Editura Academiei Române, București, 1976
4. Diculescu I., Onicescu D., Benga G., Popescu L.M., *Biologie celulară*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1983
5. Raicu P., Ionescu-Varo M., Gancevici G., Moisesescu G., *Celula, structură, ultra-structură și funcții*, Editura Academiei Române, București, 1982
6. Schleif R.F., *Practical Methods in Molecular Biology*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1981
7. Berman H.M., Westbrook J., Feny Z., Iype L., Schneider B., Zordecki C., *Structural Bioinformatics*, 2013
8. Cannoere J.J., Subramanian S., Schnare M.N., Collett J.R., D'Souza L.M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabursy L.V., Muller K.M., Pande N., Shang Z., Yu N., Guttel R.R., *BMC Bioinformatics* 3, 2002

9. Batenburg F.H.D., van Galtynaev A.P., Pleiy C.W.A., Nucleic Acid Res., 29, 2011
10. Griffiths-Jones S., Batelnan A., Marshall M., Khanna A., Eddy S.R., Nature Rev. Genet., 31, 2001
11. Gan H.H., Pasquali S., Schlick T., Nucleic Acid Res., 31, 2013
12. Eddy S.R., Nature Rev. Genet., 2, 2001
13. Rivas E., Klein R.J., Jones T.A., Eddy S.R., Curr. Biol., 11, 2001
14. Storz G., Science, 296, 2002
15. Watson J.D., Crick H.C., *A Structure for Deoxyribose, Nucleic Acid, Nature*, 2 April, 1953, Vol.171, 737 1953. Commentary by Tom Zinner.
16. Tănase I, *Tehnica cromatografică*, Editura Tehnică, București, 1967
17. Zarnea G., Mihăescu Gr., *Imunologie*, Editura Univ. București, 1995
18. Zarnea G., *Tratat de Microbiologie* vol. IV Imunologie, Ed. Academiei Române, București, 1990
19. Baggot J., Dennis E.S., Net Biochem, *Maceomolecules*, Utah University, 1995
20. Neidle St., *Principles of Nucleic Acid Structure*, Academic Press, 2007
21. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnel J., *Molecular Cell Biology*, Freeman H.V., New York, 2000
22. Etheve L., Martin J., Lavery R., *Protein-DNA interfaces: a molecular dynamics analysis of time-dependent recognition processes for three transcription factors*, Nucleic Acid Research, Vol.44 (20), 2016
23. Cayer D.M., Kristopher L. Nazor K.L., Nicholas J. Schork N.J., *Mission critical: the need for proteomics in the era of next-generation sequencing and precision medicine*, Human Molecular Genetics 25, R2, 2016
24. Travers A., Muskhelishvili G., *DNA structure and function*, FEBS Journal, Vol.282 (12), 2015

CAPITOLUL 7

7. AMINOACIZI

7.1. Considerații generale	602
7.2. Proprietățile fizice ale aminoacizilor	614
7.3. Proprietățile chimice ale aminoacizilor	625
7.4. Stereochimia aminoacizilor	631
7.4.1. Configurația aminoacizilor	633
7.5. Biochimia aminoacizilor	641
7.5.1. Aminoacizii în alimentație	641
7.5.2. Degradarea oxidativă a aminoacizilor	643
7.5.3. Decarboxilarea aminoacizilor de către microorganisme	653
7.5.4. Transaminarea	656
7.6. Aminoacizi mai importanți și derivații lor	658
7.7. Sinteze de aminoacizi	664

<i>Bibliografie</i>	671
---------------------	-----

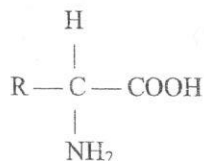
7.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Aminoacizii sunt unitățile constituente ale proteinelor, ei determinând multe din proprietățile importante ale acestora.

Primul aminoacid separat dintr-un hidrolizat proteic a fost glicocolul sau glicina de către H. Braconnot [1].

În proteine se găsesc frecvent 20 de aminoacizi. Pe lângă aceștia sunt cunoscuți și alți aminoacizi care îndeplinesc unele funcții în celule, precum și în unele microorganisme și plante.

Formula generală structurală a celor 20 de α -aminoacizi, frecvent întâlniți în proteine, cu excepția prolinei, prezintă o grupare amino liberă și o grupare carboxil liberă, ambele legate la un atom de carbon α , precum și o catenă laterală R. Aminoacizii se deosebesc între ei prin structura catenelor laterale, numite resturi laterale R:



După proprietățile lor, aminoacizii se pot grupa în două clase: *alifatici* și *aromatici*.

Din prima clasă fac parte aminoacizii care au grupele COOH și NH₂ legate la o catenă alifatică, chiar dacă molecula lor cuprinde și inele aromatice sau heterociclice.

În moleculele aminoacizilor aromatici cele două grupe funcționale sunt legate de un inel arilic.

Aminoacizii alifatici, după poziția ocupată în catenă de grupa aminică față de grupa carboxilică, se împart α -, β -, γ -aminoacizi etc.

După structura lor chimică se disting șase grupe de α -aminoacizi prezenți în proteine:

1. *Aminoacizi monoamino-monocarboxilici:*

glicocolul sau glicina, alanina, valina, leucina, izoleucina și fenilalanina;

2. *Aminoacizi dicarboxilici:*

acidul asparagic (acidul aspartic), acidul glutamic;

3. *Hidroxi-aminoacizi:*

serina, treonina, tirozina;

4. *Tioaminoacizi:*

cisteina, cistina, metionina;

5. *Diaminoacizi:*

ornitina, lizina, arginina, hidroxilizina;

6. *Aminiacizi heterociclici:*

Prolina, hidroxiprolina, histidina, triptofanul

Se menționează că cisteina se obține la hidroliza proteinelor, de obicei, sub formă de cistină, iar ornitina este conținută în proteine sub formă de arginină. În afară de aminoacizii prezentați mai sus, se găsesc în natură un număr destul de mare de aminoacizi mai rari, în unele proteine, peptide, în plante, în unele microorganisme etc.

O clasificare importantă a aminoacizilor este cea bazată pe polaritatea resturilor lor laterale, notate cu R. După această clasificare, aminoacizii se grupează în patru clase principale:

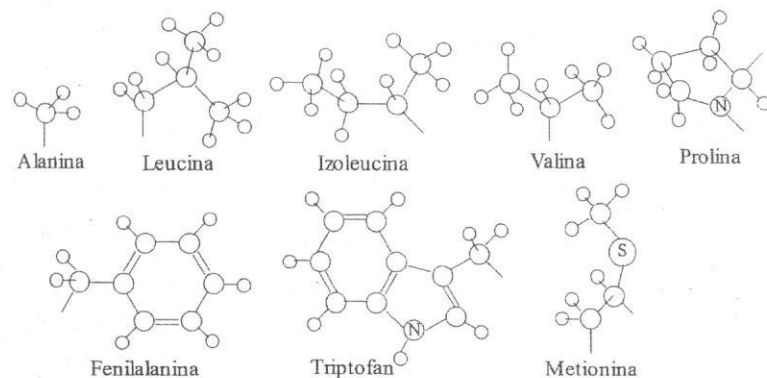
1. *Aminoacizi cu radicali nepolari sau hidrofobi;*2. *Aminoacizi cu radicali încărcăți pozitiv;*3. *Aminoacizi cu radicali încărcăți negativ* (între pH 6,0 și 7,0, intervalul de pH intracelular);4. *Aminoacizi cu radicali polari neutri* (grupări neîncărcate).

În cadrul aceleiași clase de aminoacizi sunt variații considerabile în ceea ce privește mărimea, forma și proprietățile radicalilor R. Acest mod de clasificare a aminoacizilor poate fi pus în legătură cu cuvintele codului genetic pentru diferiții aminoacizi prezenți în proteine.

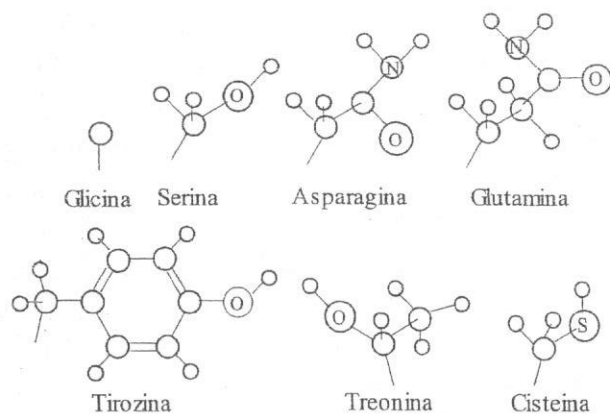
În rândul aminoacizilor cu radicali nepolari fac parte cinci aminoacizi cu radicali R alifatici (alanina, leucina, izoleucina, valina și prolina), doi amino-

acizi cu ciclu aromatic (fenilalanina și triptofanul) și un aminoacid cu sulf (metionina).

Aminoacizii din această clasă sunt mai puțin solubili în apă decât aminoacizii cu radicali R polari. Prolina, un iminoacid, poate fi socotită ca un α -aminoacid în care radicalul R este un substituent în gruparea amino.



Aminoacizi cu radicali nepolari (hidrofobi)



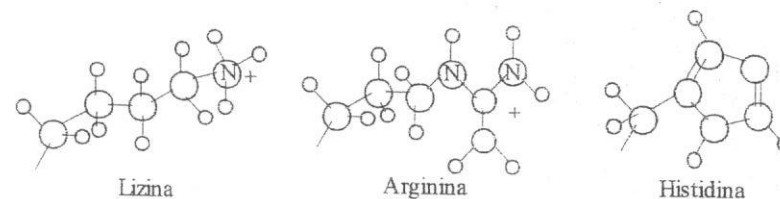
Aminoacizi cu radicali polari neîncărcați

Aminoacizii cu radicali polari neîncărcați au la radicalii R grupări funcționale polare neutre care pot forma legături de hidrogen cu apa; ei sunt mai solubili în apă decât aminoacizii cu radicali R nepolari.

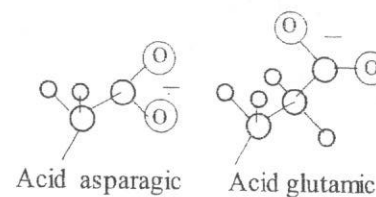
Polaritatea serinei, tirozinei și treoninei este datorită grupărilor lor hidroxilice, polaritatea asparaginei și glutaminei datorită grupărilor amidice și cea a cisteinei grupării sulfhidrilice.

Glicina este la limita de demarcație a acestei grupe, deoarece radicalul său R este un atom de hidrogen, care nu poate influența polaritatea grupelor α -aminice și α -carboxilice.

Aminoacizii cu radicali încărcăți pozitiv au radicalii R cu sarcini net pozitive la pH=7,0, care se datoresc grupării ϵ -aminice la lizină, grupei guanidinice de la arginină și grupării imidazolice la histidină, care este slab bazică și plasează histidina la limita de demarcație a acestei clase de aminoacizi. La pH=6,0, aproximativ 50% din moleculele de histidină posedă un radical R protonat, încărcat pozitiv și la pH=7,0 circa 10% din molecule au sarcină pozitivă.



Aminoacizi cu radicali încărcăți pozitiv (bazici)



Acizi cu radicali încărcăți negativ (acizi)

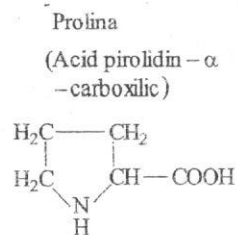
Aminoacizii cu radicali R încărcăți negativ (acidul asparagic și acidul glutamic) au câte o grupă carboxilică la radicalul R complet ionizată și deci încărcată negativ între pH=6 și pH=7. În tabelul 7.1. se dau formulele chimice, simbolurile și masele moleculare ale unor aminoacizi din proteine.

Tabelul 7.1.

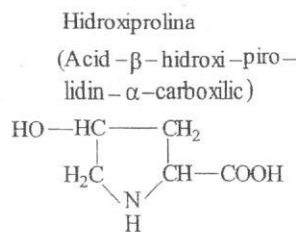
Formulele chimice, simbolurile și masele moleculare ale aminoacizilor

Glicina (Acid aminoacetic) $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Gly sau Gli Masa mol. = 75	Alanina (Acid α-aminopropionic) $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Ala Masa mol. = 89	Valina (Acid α-aminoizovalerianic) $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Val Masa mol. = 117
Leucina (Acid α-aminoizocaproic) $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Leu Masa mol. = 131	Izoleucina (Acid β-metil-α-aminovalerianic) $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Ile Masa mol. = 131	Fenilalanina (Acid β-fenil-α-aminopropionic) $\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Phe Masa mol. = 165
Acid asparagic (aspartic) (Acid aminosuccinic) $\begin{array}{c} \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Asp Masa mol. = 133	Acid glutamic (Acid α-aminoglutaric) $\begin{array}{c} \text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Gu Masa mol. = 147	

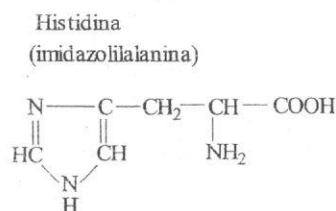
Serina (Hidroxi-alanina) $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Simbol = Ser Masa mol. = 105	Treonina (Acid β-hidroxi-α-aminobutiric) $\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CHOH} \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Simbol = Thr Masa mol. = 119	Tirozina (p-hidroxi-fenilalanina) $\begin{array}{c} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Tyr Masa mol. = 181
Cisteina $\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{SH} \\ \\ \text{CHNH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \xrightleftharpoons[\text{red.}]{\text{oxid.}} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CHNH}_2 \quad \text{CHNH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \text{COOH} \end{array}$ Simbol = Cys Masa mol. = 121	Cistina (Acid di-α-amino-β-propionic) $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CHNH}_2 \quad \text{CHNH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \text{COOH} \end{array}$ Simbol = Cys - Cys Masa mol. = 240	Metionina (Acid α-amino-γ-metiltiobutiric) $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{S}-\text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Met Masa mol. = 149
Ornitina (Acid α,δ-diaminovalerianic) $\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Orn Masa mol. = 132	Lizina (Acid α,g-diaminocaproic) $\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Lys Masa mol. = 146	
Arginina (Acid δ-guanidil-α-aminovalerianic) $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Simbol = Arg Masa mol. = 174		



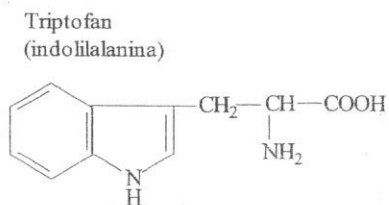
Simbol = Pro
Masa mol. = 115



Simbol = Hipro
Masa mol. = 131



Simbol = His
Masa mol. = 155



Simbol = Trp
Masa mol. = 204

În tabelul 7.2. sunt prezentate o serie de caracteristici ale L-aminoacizilor și anume: aminoacizii esențiali, notați cu E, structura radicalului R a fiecărui aminoacid, simbolul conform normelor IUPAC, rotația optică, punctul de topire, pK pentru α -COOH și α -NH₂ și pH_I.

Se menționează că ornitina este conținută în proteine sub formă de arginină care, la hidroliză, pierde grupa guanidinică. Cisteina se obține, la hidroliza proteinelor, de obicei sub formă de cistină.

Natura chimică a resturilor laterale ale aminoacizilor pot fi grupate astfel : hidrocarbură alifatică la glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; alcoolică la serină și treonină; tiolică la cisteină; punte disulfidică la cistină; tioeterică la metionină; hidrocarbură aromatică la fenilalanină; fenolică la tirozină; heterociclu aromatic la triptofan; heterociclu nearomatic la histidină, prolină și

hidroxiprolină; acizi organici la acidul asparagic și acidul glutamic; bază organică la arginină, lizină și histidină.

Tabelul 7.2.

Unele caracteristici ale L-aminoacizilor

Denumirea	Structura $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$ R R = se dă mai jos pentru fiecare aminoacid	Solu- bilit. în apă la 25°C în% subst. uscată	Sen- sul rota- ției optice	pK _a		pH _I
				α -COOH	α -NH ₂	
1	2	3	4	5	6	7
Glicină	— H	24,99	—	2,34	9,60	8
Alanină	— CH ₃	16,51	+	2,35	9,66	6,02
Valină (E)	— CH(CH ₃) ₂	8,85	+	2,32	9,62	5,97
Leucină (E)	— CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	2,19	—	2,36	9,60	5,98
Izoleucină (E)	— CH(CH ₃)CH—CH ₃	4,12	+	2,36	9,68	6,02
Serină	— CH ₂ —OH	52,00	—	2,21	9,15	5,68
Treonină (E)	— CH(OH)—CH ₃	1,59	—	2,09	9,10	5,60
Cisteină	— CH ₂ —SH	—	—	1,71	9,90	5,02
Cistină	— CH ₂ —S—S—CH ₂ —	0,011	—	1,65	7,86	5,06
Metionină (E)	— (CH ₂)—S—CH ₃	3,38	—	2,26	9,85	5,06
Acid aspartic	— CH ₂ —COOH	0,50	—	2,28	9,21	2,98
Acid glutamic	— (CH ₂) ₂ —COOH	0,84	+	2,09	9,82	3,22
Asparagină	— CH ₂ —CO—NH ₂	—	—	2,19	9,67	5,41
Glutamină	— (CH ₂) ₂ —CO—NH ₂	—	+	2,02	8,80	5,70
Ornitină	— (CH ₂) ₃ —NH ₂	—	+	2,17	9,13	9,70
Lizină	— (CH ₂) ₄ —NH ₂	f.bună	+	1,94	8,65	9,74
Histidină E	— CH ₂ —C—N CH C V NH	4,29	—	2,18	8,95	7,59
Arginină (E)	— (CH ₂) ₃ —NH—C NH	f.bună	+	2,17	9,04	10,8

Fenilalanină (E)	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	2,96	-	1,83	9,13	5,48
Triptofan (E)	$ \begin{array}{c} \text{CH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{CH} \\ \parallel \quad \parallel \quad \\ \text{CH} \quad \text{C} \quad \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \quad \text{CH} \end{array} $	1,13	-	2,38	9,39	5,88
Tirozină	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	0,045	-	2,20	9,11	5,67
Prolină	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}-\text{COO}- \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N}^+ \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $	f.bună	-	1,99	10,60	6,30
Hidroxi-prolină	$ \begin{array}{c} \text{OH}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{C}-\text{COO}- \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \quad \text{H} \\ / \quad + \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $	36,11	-	1,92	9,73	6,33

În tabelul 7.3. se dau câteva caracteristici ale resturilor laterale ale unor aminoacizi din compoziția proteinelor.

Prin neutralizarea reciprocă a grupelor carboxilice și aminice rezultă o structură amfionică, care determină existența unui punct izoelectric (pH_i), specific pentru fiecare aminoacid și proprietăți de substanță tampon. În general, aminoacizii se topesc cu descompunere la peste 200°C .

Aminoacizii sunt solubili în apă și insolubili în solvenți nepolari. Unii aminoacizi, în anumite domenii de pH, sunt foarte greu solubili. Solubilitatea aminoacizilor este influențată de prezența ionilor străini.

În tabelele 7.4. și 7.5. sunt prezentați aminoacizi rari care se găsesc în pro-

teinele fibroase, în plante și în fungi.

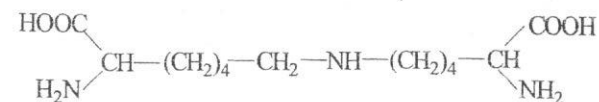
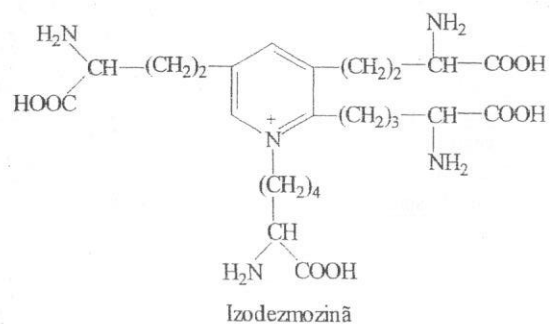
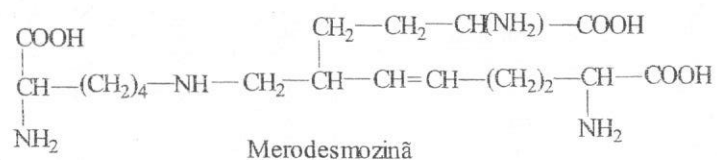
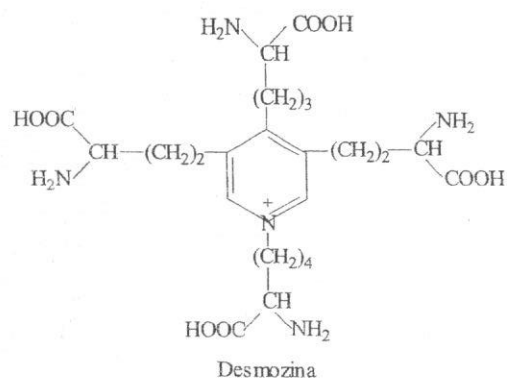
Tabelul 7.3.

Caracteristicile de bază a radicalilor R aminoacizilor care se găsesc în compoziția proteinelor

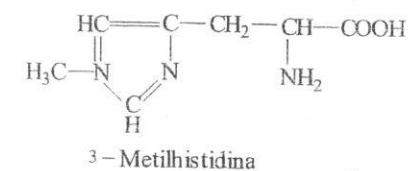
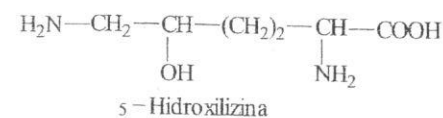
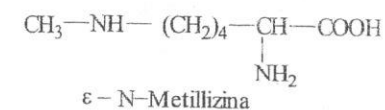
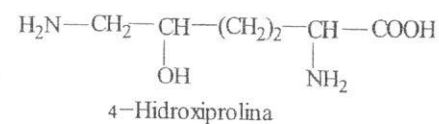
Amino-acidul	Radicalul R	Alifatic, Al Aromatic, Ar Heterociclic, He	Acid, A Bazic, B Neutr, N	Polar, P Slab polar, SP Nepolar, NP	Ionic, I Slab ionic, SI Netonic, NI
Alanină	Metil-	Al	N	NP	NI
Arginină	ω -Guanidino-n-propil-	Al	B	P	I
Acid asparagic	Carboximetil-	Al	A	P	I
Valină	Izopropil-	Al	N	NP	NI
Acid glutamic	Carboxietil-	Al	A	P	I
Glicină	H-	Al	N	NP	NI
Histidină	Imidazolimetil-	He	B	P	I
Izoleucină	α -Metil-n-propil-	Al	N	NP	NI
Leucină	Izobutil-	Al	N	NP	NI
Lizină	ω -Amino-n-butil-	Al	B	P	I
Metionină	Metiltioetil-	Al	N	P	NI
Hidroxiprolină	-	He	N	P	NI
Prolină	-	He	N	NP	NI
Serină	Hidroximetil-	Al	N	P	NI
Treonină	α -Hidroxietil-	Al	N	P	NI
Triptofan	Scatil-	He Ar	N	NP	NI
Tirozină	n-Hidroxibenzil-	Ar	N	SP	SI
Fenilalanină	Benzil-	Ar	N	NP	NI
Cisteină	Metiltio-	Al	N	P	SI
Cistină	Dimetildisulfid-	Al	N	NP	NI

Tabelul 7.4.

Aminoacizi rari întâlniți în proteinele fibroase.

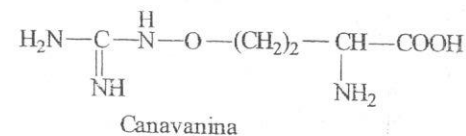
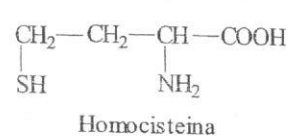
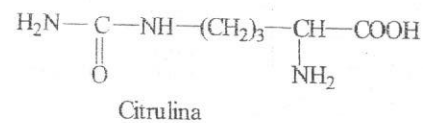
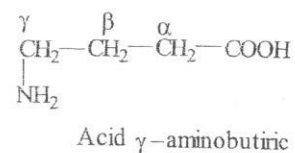


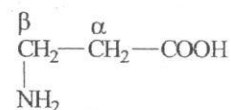
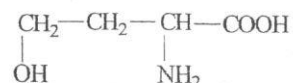
Lizinonorleucina



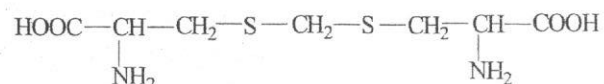
Tabelul 7.5.

Aminoacizi rari din plante și fungi

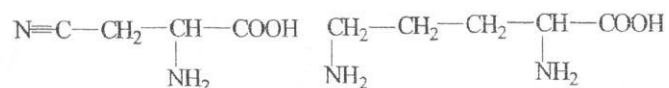


 β -Alanina

Homoserina



Acid djencolic

 β -Cianalanină

Ornitină

7.2. PROPRIETĂȚILE FIZICE ALE AMINOACIZILOR

Aminoacizii sunt substanțe solide, albe, cristalizate, care se topesc la temperaturi de peste 200°C, cu descompunere, nu pot fi distilați nici măcar la vid.

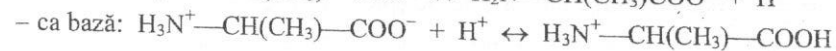
Rețeaua moleculară a aminoacidului în stare cristalină este stabilizată prin forțe electrostatice de atracție între grupări cu sarcini opuse.

Aminoacizii sunt obișnuit solubili în apă și insolubili în dizolvanții nepolari, asemănându-se din acest punct de vedere cu electroliții. Solubilitatea în apă scade odată cu creșterea radicalilor hidrocarbonați și variază în funcție de pH și de ioni străini aflați în soluție. Această variație se datorește solubilității diferite a speciilor de ioni care apar la diferite valori de pH și are importanță practică.

Unii aminoacizi, în anumite domenii de pH, sunt foarte greu solubili și se pot obține cristalizați din hidrolizatele proteice. De exemplu, în cazul acidului glutamic, clorhidratul său, adică cationul, are solubilitate minimă. La același pH, solubilitatea aminoacizilor este influențată de ioni străini din soluție.

Din soluții apoase neutre, aminoacizii cristalizează mai ușor ca ioni dipolari ($\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-$). În soluții apoase neutre cu constante dielectrice ridicate și momente dipol mari, dovedesc prezența, în aceeași moleculă, a sarcinilor pozitive și negative.

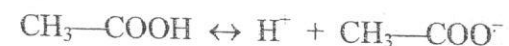
Când un aminoacid este dizolvat în apă, el poate acționa atât ca un acid (donor de proton) cât și ca bază (acceptor de proton), de exemplu, alanina:



Substanțele cu astfel de proprietăți sunt amfotere și sunt numite amfoliți.

Comportarea acido-bazică a amfoliților este explicată de teoria acido-bazică elaborată de M.N. Brönsted și T.M. Lowry, în sisteme apoase diluate. După această teorie, un acid este un donor de protoni iar o bază un acceptor de protoni. O reacție acid-bază necesită o pereche acid-bază conjugată, formată dintr-un donor de protoni și un acceptor de protoni.

De exemplu, acidul acetic este donor de protoni, iar ionul acetat este acceptor de protoni și împreună ei formează o pereche acid-bază conjugată:



Ecuația pentru disocierea unui acid (HA) în soluție apoasă diluată, implică transferul unui proton de la acid la apă, care acționează ea însăși ca acceptor de protoni pentru a da acidul H_3O^+ :



Fiecare bază conjugată are o afinitate caracteristică pentru protoni, exprimată în afinitatea OH^- pentru proton.

Acizii care au o slabă tendință de a elibera protoni în apă sunt acizi slabi, iar cei care eliberează protoni cu ușurință sunt acizi tari.

Tendința oricărui acid de a disocia este exprimată prin constanta de disociere la o anumită temperatură:

$$K = \frac{(H^+)(A^-)}{(HA)}$$

În biochimie se folosesc constantele de disociere obținute din măsurători analitice ale concentrației reactanților și produșilor în anumite condiții experimentale. O astfel de constantă de disociere aparentă este notată cu K' , iar pK' reprezintă exprimarea logaritmică a lui K' ($pK' = \lg 1/K'$).

În tabelul 7.6. se dau valorile lui pK' pentru unii aminoacizi.

Din datele tabelului 7.6. rezultă următoarele însușiri ale fizico-chimiei aminoacizilor:

- Grupările carboxilice de la acizii monoaminomonocarboxilici se comportă ca acizi mai puternici decât grupările carboxilice ale acizilor alifatici (acidul acetic are $pK'=4,76$).
- Toți aminoacizii monoaminomonocarboxilici cu radicali R neîncărcați au valorile pK'_1 și pK'_2 aproape identice (glicina, alanina, leucina). Aminoacizii monoaminomonocarboxilici, în afară de histidină, au o insuficientă capacitate de tamponare la pH-ul fiziologic ($pH = 6-8$). Ei au capacitate de tamponare bună la pH-uri apropiate de pK'_1 (1,3–3,3) și de pK'_2 (8,6–10,6).
- Gruparea β -carboxil de la acidul aspartic și gruparea γ -carboxil de la acidul glutamic sunt complet ionizate la $pH=7$ și au valori mai mari ale pK' decât valorile pK' ale grupărilor α -carboxilice și aproape egale cu ale acizilor carboxilici alifatici (acidul acetic).
- Gruparea sulfhidril a cisteinei și gruparea p-hidroxil a tirozinei sunt foarte slab acide și la $pH=7$, ionizează foarte puțin (8% gruparea $-SH$ și 0,01% gruparea $-OH$ a tirozinei).
- Gruparea ϵ -aminică a lizinei și gruparea guanidinică a argininei sunt puternic bazice. Acești aminoacizi la valoarea pH-ului egală cu 7 au sarcini net pozitive.

Tabelul 7.6.

Valorile pK' pentru grupările ionizate ale unor aminoacizi la $25^\circ C$ [1].

Amino-acidul	pK' $\alpha-COOH$	PK_2 $\alpha-NH_3^+$	PK_R' radical R
Glicocol	2,34	9,60	-
Alanină	2,34	9,69	-
Leucină	2,36	9,60	-
Serină	2,21	9,15	-
Treonină	2,63	10,43	-
Glutamină	2,17	9,13	-
Acid aspartic	2,09	9,82	3,86
Acid glutamic	2,19	9,67	4,25
Histidină	1,82	9,17	6,00
Cisteină	1,71	8,33	10,78
Tirozină	2,20	9,11	10,07
Lizină	2,18	8,95	10,53
Arginină	2,17	9,04	12,48

Curbele de titrare ale aminoacizilor cu radicali R ionizabili sunt mai complexe, ele fiind o combinație între curba care corespunde ionizării radicalului R și curbele corespunzătoare grupărilor α -aminice și α -carboxilice (Fig.7.1.).

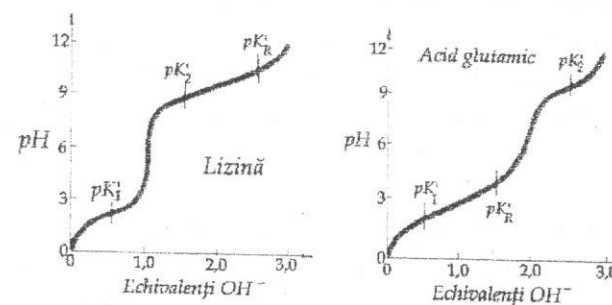


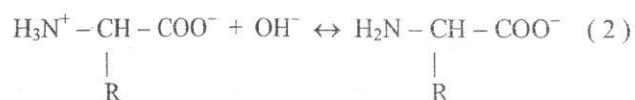
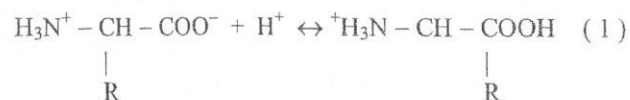
Fig.7.1. Curbele de titrare ale acidului glutamic și a lizinei. pK' -ul radicalului R este notat cu pK_R [1].

Formula (I) a aminoacizilor care conține o grupare -NH_2 și o grupare -COOH nu reprezintă corect structura acestor compuși, deoarece cele două grupe se neutralizează reciproc.

Aminoacizii au structura unor amfioni sau ioni bipolari (II):



Datorită caracterului lor amfoter, aminoacizii formează săruri atât cu acizii cât și cu bazele:



Aminoacizii în mediu acid se comportă ca baze, iar în mediu bazic ca acizi.

Dacă în soluția unui aminoacid se adaugă un acid, ionii de hidrogen dispar conform reacției [1]; dacă se adaugă un hidroxid alcalin, ionii hidroxil se neutralizează conform reacției [2].

În ambele cazuri, pH-ul soluției nu se schimbă în mod apreciabil. Pe această proprietate se bazează utilizarea amino-acizilor în soluțiile tampon.

În soluție acidă, aminoacizii sunt cationi și migrează la electroliză spre catod, iar în soluție bazică sunt anioni și migrează spre anod.

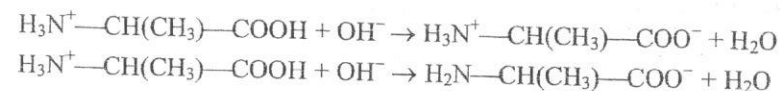
Amfionul nu contribuie la transportul curentului electric, nu migrează în câmpul electric, fiind atras în mod egal de catod și de anod. S-a constatat că în soluție aminoacizii nu există sub formă de molecule neutre de tip (I) decât într-o cantitate imperceptibil de mică. Dacă aminoacizii ar exista în formula (I), în soluție nu ar migra sub influența câmpului electric.

Grupările -COOH din pozițiile γ sau δ ale acizilor asparagic și glutamic și gruparea -NH_2 din poziția ϵ a lizinei, precum și unul din atomii de azot ai

nucleului imidazolic din histidină au, de asemenea, capacitatea să accepte sau să doneze protoni.

Un α -aminoacid monoaminomonocarboxilic, cum este alanina, este considerat a fi un acid dibazic în formă complet protonată, care poate dona protoni în timpul titrării sale complete cu o bază.

Desfășurarea unei asemenea titrări cu NaOH, care decurge în două trepte, poate fi reprezentată prin ecuațiile următoare:



La $\text{pH} = 2,34$, punctul de echivalență a primei trepte, donorul de protoni ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$) și acceptorul de protoni ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}^-$) se găsesc la concentrații echimoleculare. La $\text{pH} = 9,69$, cele două specii ($\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}^-$) și ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}^-$) se găsesc în concentrații echimoleculare.

Se pot calcula speciile ionice ale aminoacidului la orice valoare de pH, dacă se cunosc valorile pentru pK_1' și pK_2' , cu ajutorul ecuației Henderson-Hasselbalch.

Valoarea pK' a unui aminoacid se poate calcula din pH în orice punct al curbei de titrare a unui aminoacid, dacă sunt cunoscute concentrațiile speciilor acceptoare și donoare de protoni.

La $\text{pH} = 6,02$ este un punct de inflexiune între cele două trepte ale curbei de titrare a alaninei. La acest pH, molecula nu prezintă sarcină electrică netă și nici nu migrează în câmpul electric, este pH_i . $\text{pH}_i = \frac{1}{2}(\text{pK}_1' + \text{pK}_2')$.

În figura 7.2. se prezintă curba de titrare difazică a alaninei [1]. Fiecare treaptă prezintă un punct de echivalență ($\text{pK}_1' = 2,34$ și $\text{pK}_2' = 9,69$) unde modificarea pH-ului este minimă când se adaugă cantități crescute de OH^- .

Aspectul curbei de titrare poate fi exprimat prin ecuația Henderson-Hasselbalch, care este o transformare logaritmică a relației pentru constanta de disociere:

$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \text{ din care, } H^+ = K' \frac{[HA]}{[A^-]}$$

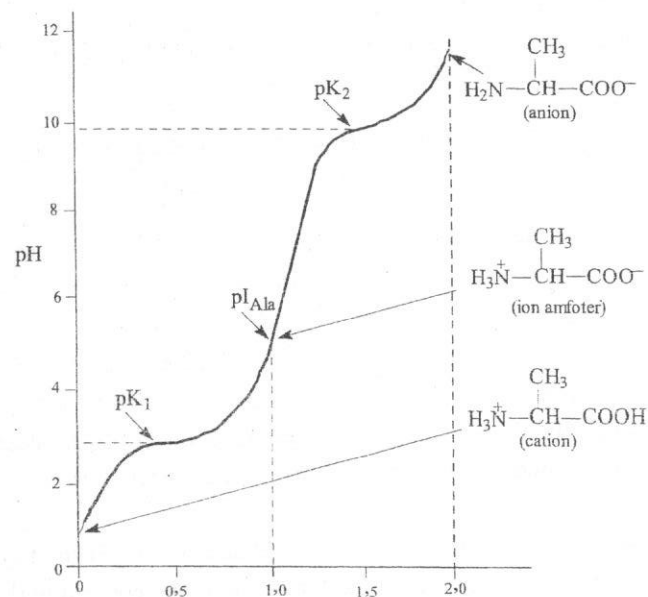


Fig. 7.2. Curba de titrare a alaninei

Luând logaritmul cu semn negativ pentru ambele părți ale egalității:

$$-\lg [H^+] = -\lg K' - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Aceasta permite calcularea lui pK' pentru orice acid din raportul molar al speciilor donoare și acceptoare de electroni la un anumit pH, de a calcula pH-ul unei perechi conjugate acid-bază la un anumit pK' .

Când concentrațiile donorului și acceptorului de electroni sunt egale, pH-ul este egal cu pK' .

Substituind $-\lg[H^+] = pH$ și $-\lg K' = pK'$ se obține:

$$pH = pK + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

sau într-o formă mai generală:

$$pH = pK + \lg \frac{[\text{acceptor de protoni}]}{[\text{donor de protoni}]}$$

Cu ajutorul razelor X s-au determinat distanțele și unghiurile interatomice în molecula de glicină cristalizată. După cum se vede din Fig. 7.3. [2], cele două distanțe C-O de 1,25 Å și 1,27 Å sunt egale între ele, în limita erorilor experimentale și egale cu distanța C-O din ionul carboxil (1,27 Å), dar mult deosebite de distanțele C-O din carboxilul neionizat.

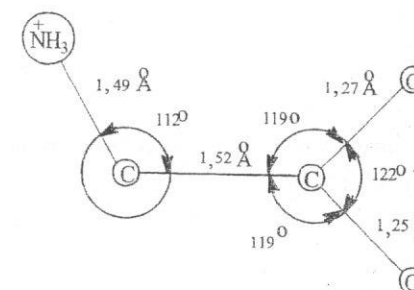


Fig. 7.3. Distanțe interatomice și unghiuri în molecule glicinei determinate cu raze X

Pe baza cercetării unui număr mare de substanțe cristalizate s-a ajuns la concluzia că cele trei tipuri de legături chimice ce pot apărea într-un cristal se deosebesc între ele prin distanțele dintre atomi. Cea mai scurtă este legătura covalentă, care este și cea mai puternică.

Legăturile covalente dintre elementele din perioada a doua a sistemului periodic al elementelor (C, N, O, F, Li, Be, B) variază între 1,2 și 1,8 Å între ele prin distanțele lor.

Ionii monoatomici ai elementelor din perioada a doua care se găsesc în cristalele ionice, variază cu distanțe de 2,0-2,5 Å unui față de alții. Cele mai

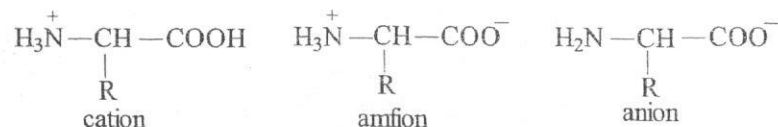
mici distanțe între moleculele unui cristal molecular, unite prin forțe van der Waals, sunt de 3,3–4,0 Å.

Aminoacizii conțin în centre diferite ale moleculei sarcini electrice de semn contrar și au momente electrice mari. De aceea ei măresc constanta dielectrică a apei în care sunt dizolvați.

În cazul aminoacizilor, contracția de volum ce se produce la dizolvarea lor în apă (electrostricția) este deosebit de mare. Astfel, dacă se dizolvă în apă un mol de glicină, care are 75 g și un volum de 47 ml, soluția rezultată crește în volum doar cu 43,5 ml.

Aceasta se explică prin faptul că se stabilesc forțe puternice de tip ioni-dipoli între dizolvant și dizolvat, ceea ce confirmă caracterul ionic al aminoacizilor.

Într-o soluție apoasă a unui aminoacid monoaminic și monocarboxilic, există următorii ioni (moleculele neutre, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$, sunt într-o concentrație atât de mică încât pot fi neglijate):



Conform teoriei acizilor și bazelor a lui Brönsted, "cationul" din formula de mai sus este un acid bibazic, iar amfionul un acid monobazic. Dintre cele două grupe acide, COOH și NH_3^+ , din cation, prima este cea mai puternic acidă. Ionizarea va avea loc în două etape, ca la orice acid dicarboxilic:



Constantele de ionizare ale celor două grupe acide se vor reprezenta, conform legii maselor, prin următoarele ecuații, în care soluția este considerată suficient de diluată pentru ca activitățile să poată fi înlocuite prin concentrații:

$$K_1 = \frac{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-)(\text{H}^+)}{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COOH})} \quad (3)$$

$$K_2 = \frac{(\text{NH}_2-\text{CHR}-\text{COO}^-)(\text{H}^+)}{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-)} \quad (4)$$

Prin logaritmare, ecuația (3) devine:

$$\log K_1 = \log (\text{H}^+) + \log \frac{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-)}{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COOH})} \quad (5)$$

Dacă se înlocuiește $-\log (\text{H}^+)$ cu pH și $-\log K_1$ cu $\text{p}K_1$ se obține:

$$\text{p}K_1 = \text{pH} - \log \frac{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-)}{(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COOH})} \quad (6)$$

Din această ecuație rezultă că atunci când raportul concentrațiilor:

$$(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COO}^-)/(\text{H}_3\text{N}^+-\text{CHR}-\text{COOH})$$

este egal cu unitatea, exponentul de aciditate $\text{p}K_1$ va fi egal cu pH. Pentru a se afla mărimea $\text{p}K_1$ se titrează potențimetric aminoacidul cu acid clorhidric și se înscrie într-o diagramă pH-ul în funcție de cantitatea de acid adăugată.

Se constată că $\text{p}K_1$ este egal cu pH-ul soluției în momentul când aminoacidul este neutralizat pe jumătate.

Constanta $\text{p}K_2$ se află în mod similar titrând aminoacidul cu hidroxid de sodiu până la semineutralizare și măsurând pH-ul acestei soluții [2].

Dacă o soluție apoasă de aminoacizi monoaminomonocarboxilici ar conține numai amfioni, $\text{NH}_3^+-\text{CHR}-\text{COO}^-$, soluția ar avea același pH ca și apa pură.

Soluțiile de aminoacizi sunt slab acide, deoarece grupa carboxilică este mai ionizată decât grupa aminică, deci soluțiile conțin o cantitate mică de ioni de hidrogen și anioni, $\text{NH}_2\text{—CHR—COO}^-$, alături de anioni în mare exces. Dacă se adaugă un acid, echilibrul de ionizare de deplasează astfel încât se formează cationi, $\text{H}_3\text{N}^+\text{—CHR—COOH}$, pe seama anionilor.

Se numește *punct izoelectric*, pH_i , al unui aminoacid, acea concentrație a ionilor de hidrogen la care soluția sa conține anioni și cationi ai aminoacidului în proporție egală.

$$\begin{aligned} (\text{H}_3\text{N}^+\text{—CHR—COOH}) &= \frac{(\text{H}_3\text{N}^+\text{—CHR—COO}^-)(\text{H}^+)}{K_1} \\ (\text{NH}_2\text{—CHR—COO}^-) &= \frac{(\text{H}_3\text{N}^+\text{—CHR—COO}^-)K_2}{(\text{H}^+)} \end{aligned}$$

Ecuatiile (3) și (4) se pot scrie în forma:

Egalând, se obține condiția punctului izoelectric:

$$(\text{H}^+)^2 = K_1K_2 \text{ sau } (\text{H}^+) = \sqrt{K_1K_2} \text{ de unde: } \text{pH}_i = \frac{1}{2}(\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$$

Solubilitatea aminoacizilor este minimă la punctul izoelectric. Proprietatea aceasta poate servi la determinarea punctului izoelectric. De aceea, se trasează curbele solubilității aminoacidului în soluții acide și bazice, la diferite valori de pH. Punctul de întretăiere a celor două curbe corespunde punctului izoelectric.

În tabelul 7.7. se dau constantele de aciditate și punctele izoelectrice ale unor aminoacizi.

Tabelul 7.7.

Constantele de aciditate și punctele izoelectrice ale unor amino-acizi [2].

Amino-acidul	PK_1	PK_2	PK_3	pH_i
Glicină	2,35(COOH)	9,78(NH_3^+)	-	6,1
Alanină	2,34(COOH)	9,87(NH_3^+)	-	6,1
Leucină	2,36(COOH)	9,60(NH_3^+)	-	6,0
Serină	2,21(COOH)	9,15(NH_3^+)	-	5,7

Triptofan	2,38(COOH)	9,39(NH_3^+)	-	5,9
Acid asparagic	2,09(COOH)	3,87(COOH)	9,82(NH_3^+)	3,0
Acid glutamic	2,19(COOH)	4,28(COOH)	9,66(NH_3^+)	3,2
Tirozină	2,20(COOH)	9,11(NH_3^+)	10,1(OH)	5,7
Cisteină	1,96(COOH)	8,18(NH_3^+)	10,3(SH)	5,1
Arginină	2,02(COOH)	9,04(NH_3^+)	12,5(guanid.)	10,8
Lizină	2,18(COOH)	8,95($\alpha\text{-NH}_3^+$)	10,5($\epsilon\text{-NH}_3^+$)	9,7
Histidină	1,77(COOH)	6,20(imidazol)	9,20(NH_3^+)	7,6

Nici unul din aminoacizii ce se găsesc în proteine nu prezintă absorbție în vizibil. Tirozina, triptofanul și fenilalanina absorb semnificativ în ultraviolet (Fig.7.4.)

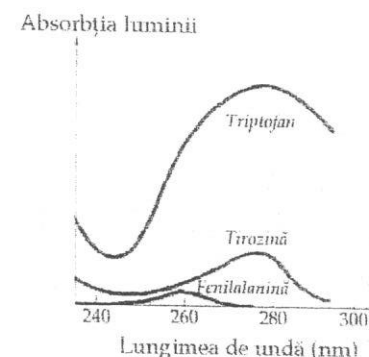


Fig.7.4. Spectrul de absorbție în ultraviolet al triptofanului, Tirozinei și a fenilalaninei [1].

Deoarece majoritatea proteinelor conțin tirozină, măsurarea absorbției luminii la 280 nm cu un spectrofotometru este o metodă rapidă de estimare a conținutului de proteine dintr-o soluție. Cistina are o absorbție slabă la 240 nm datorită grupării sale disulfidice.

Toți aminoacizii absorb în ultraviolet la < 220 nm.

7.3. PROPRIETĂȚILE CHIMICE ALE AMINOACIZILOR

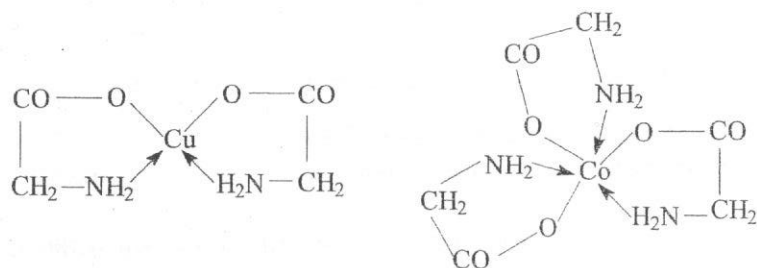
Aminoacizii formează săruri atât cu acizii tari cât și cu bazele tari.

Din cauză că soluțiile de aminoacizi nu-și variază pH-ul, când li se adaugă

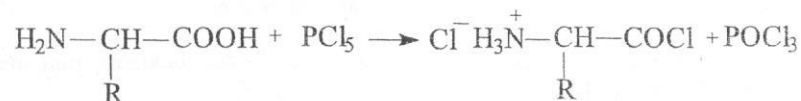
un acid sau o bază, nu pot fi titrați prin metodele acidimetrice sau alcalimetrice curente.

Dacă se adaugă soluțiilor un exces de formaldehidă, titrarea cu baze și cu indicatorii obișnuiți decurge fără dificultăți. Formaldehida reacționează cu grupele aminice ale aminoacizilor, dând baze Schiff de tipul $\text{CH}_2=\text{N}-\text{CHR}-\text{COOH}$, în care bazicitatea grupei aminice este mult diminuată.

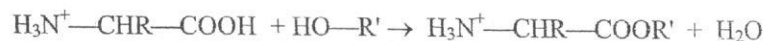
α -Aminoacizii dau cu cuprul, cobaltul și alte metale grele, săruri complexe colorate foarte greu solubile și stabile. Se prezintă mai jos complecși interni ai glicinei cu cupru și cobaltul:



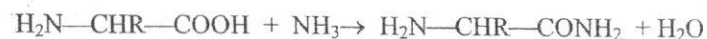
Derivați funcționali ai grupei carboxil. Aminoacizii în clorura de acetyl trec, prin tratare cu pentaoxid de fosfor în cloruri acide, care se cunosc numai sub formă de clorhidrați foarte reactivi:



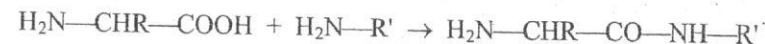
Prin esterificarea directă, cu metanol sau etanol, a aminoacizilor saturați cu acid clorhidric gazos se obțin esteri sub formă de clorhidrați. Esterii aminoacizilor au un caracter bazic, grupa carboxil fiind blocată:



Sub acțiunea amoniacului, aminoacizii dau naștere la amide:

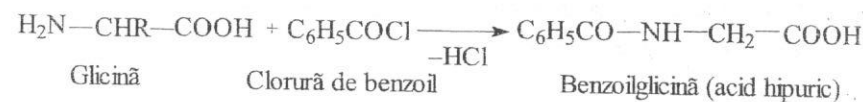


Reacția poate avea loc și cu o amină:



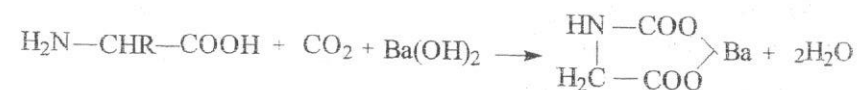
Esterii inferiori ai aminoacizilor sunt lichide care distilă sub presiune redusă. Prin încălzire, ei se transformă în dicetopiperazine și în polipeptide.

Derivați funcționali ai grupei amino. Acilarea. Prin tratarea aminoacizilor cu cloruri acide, în special cu clorură de benzoil, în prezența unui hidroxid alcalin, în soluție concentrată, se obțin N-acil derivați:



În mod asemănător reacționează și sulfoclorurile aromatice. Cloroformiații de alchil și în special cloroformiatul de benzil sunt mult utilizați pentru acilarea aminoacizilor. N-formil derivații se obțin prin formilare directă cu acid formic.

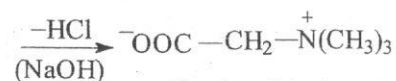
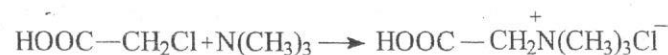
În prezența hidroxizilor alcalini sau alcalino-pământoși, aminoacizii se combină cu dioxidul de carbon și dau săruri carboxi-aminoacizi:



Acilarea duce la pierderea caracterului bazic al grupei aminice, ceea ce face ca aminoacizii acilați de tipul benzoilglicinei să se comporte ca acizi de tăria acizilor carboxilici obișnuiți.

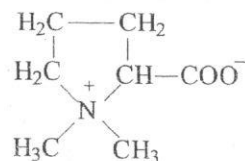
Alchilarea aminoacizilor. Betainele sunt derivații metilați cuaternari ai aminoacizilor și se pot obține prin alchilarea lor la grupa aminică printr-o tratare cu iodură sau sulfat de metil în prezența unui hidroxid alcalin.

Cel mai cunoscut este derivatul trimetilat al glicinei, care se poate obține și din acidul cloracetic și trimetilamină:



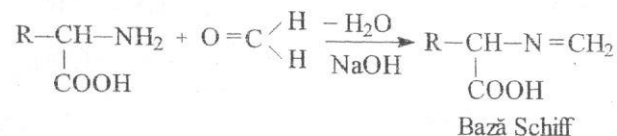
Betaina glicinei

În plante și animale se găsesc diferiți derivați cuaternari ai aminoacizilor, dintre care se menționează: betaina histidinei (*hercinina*) din unele ciuperci, betaina triptofanului (*hipaforina*) din diferite plante exotice și betaina prolinei (*stahidrina*) din unele plante, dintre care unele sunt cunoscute ca vindecătoare de răni (iarba de răni, stânjenei).



Stahidrina

Condensarea aminoacizilor cu aldehidele. În mediu alcalin, în mod analog cu aminele primare se formează baze Schiff:

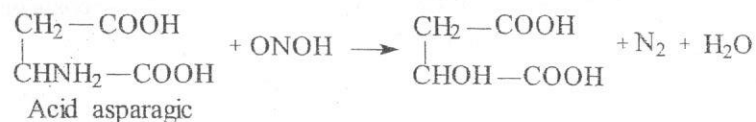


Bază Schiff

Dezaminarea cu acid azotos. Aminoacizii, în soluție, reacționează cu acidul azotos formându-se hidroxiacizi și azot care se degajă:



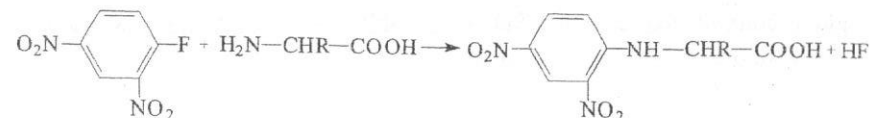
Alanină



Acid asparagic

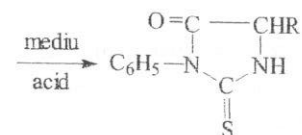
Esterii α -aminoacizilor dau, cu acidul azotos, diazoesteri, dintre care cel mai cunoscut este esterul diazoesteric, $\text{N}_2\text{CH}-\text{COOC}_2\text{H}_5$.

Reacția cu dinitrofluorbenzen (reacția Sanger) servește la separarea și recunoașterea aminoacizilor. Reacția are loc în mediu slab alcalin și rezultă dinitro-fenilderivați de culoare galbenă:



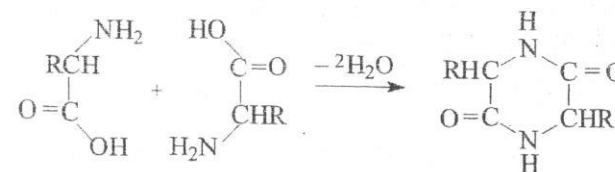
Prin hidroliză acidă se eliberează aminoacidul în stare pură.

Reacția cu fenilizocianat (reacția Edman). Reacția constă din condensarea fenilizocianatului cu grupa $-\text{NH}_2$ a α -aminoacizilor sau peptidelor:



3-fenil-5-tiohidanteina acidului aminat

Descompunerea termică. α -Aminoacizi dau, prin încălzire, mai ales în prezența glicolului, derivați ai 2, 5-dicetopiperazinei:

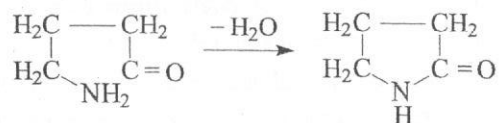


Aceste substanțe, care se numesc și "anhidride" ale aminoacizilor, se obțin cu ușurință din esterii α -aminoacizilor, prin eliminare de alcool la încălzire.

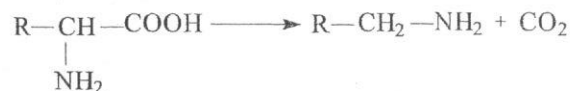
β -Aminoacizii, la încălzire, pierd ușor amoniac și trec în acizi nesaturați:



γ - și δ -Aminoacizii, prin încălzire, pierd apă și trec în lactame:

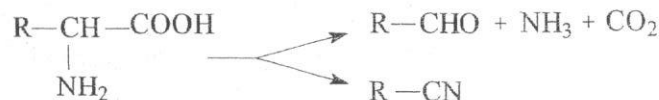


Distilarea uscată a aminoacizilor, în special în prezența hidroxidului de bariu, produce decarboxilarea cu formare de amine primare:

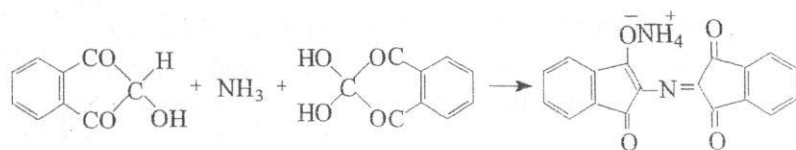
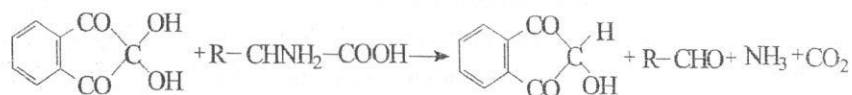


Prin topire cu hidroxid de potasiu, aminoacizii se degradează puternic și se formează acizi grași, amoniac sau amine.

Degradări oxidative. Prin oxidare cu hipocloriți alcalini, persulfati, p-toluenciorsulfonamidă sodată ($\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NClNa}$), cunoscută sub denumirea de cloramină T etc., aminoacizii trec în aldehide imediat inferioare sau chiar nitrili:



Ninhidrina (triketohidrinden-hidrat), în prezența α -aminoacizilor, dă o colorație albastru intensă, pentru care motiv se folosește ca indicator la determinările cromatografice ale acestora.



Mai întâi, aminoacizii sunt degradați oxidativ la aldehide, iar colorantul provine din condensarea cetoalcoolului care se formează la reducerea ninhidrinei cu o nouă moleculă de ninhidrină și probabil cu o moleculă de amoniac.

La cromatografia bidimensională, pe hârtie, în fenol-colidină (trimetil-piridină) α -alanina, valina, leucina, izoleucina, arginina, serina, ornitina, glutamina, metionina, acidul glutamic și triptofanul se colorează în violet; β -alanina se colorează în albastru-violet; acidul asparagic se colorează în albastrui-violet; histidina și tirozina se colorează în verde-violet; glicina și citrulina se colorează în roșu-violet; lizina se colorează în violet-închis; hidroxilizina se colorează în violet-palid; prolina se colorează în galben; hidroxiprolina se colorează în galben-brun; fenilalanina și acidul cisteinic se colorează în albastru și asparagina se colorează în portocaliu-cafeniu [3].

7.4. STEREOCHIMIA AMINOACIZILOR

În afară de glicină, toți α -aminoacizii rezultați la hidroliza proteinelor, au cel puțin un atom de carbon asimetric, rotesc planul luminii polarizate, sunt compuși optic activi și pot exista sub formă de enantiomeri. Toți compușii care sunt capabili să existe sub două forme, care nu sunt superpozabile cu imaginea lor în oglindă, au activitate optică.

Astfel de compuși se numesc chirali, de la cheir „mână” în limba greacă, deoarece imaginea în oglindă a mâinii drepte și a mâinii stângi nu sunt superpozabile. Fenomenul de stereoizomerie, numit chiralitate, se întâlnește la toți compușii care au un atom de carbon asimetric, adică un atom de carbon legat cu patru radicali diferiți.

Din cauza naturii tetraedrice a orbitalilor sp^3 ai atomului de carbon, cei patru substituenți diferiți pot ocupa în spațiu două aranjamente diferite, în jurul atomului de carbon, rezultând doi stereoizomeri sau enantiomeri.

Așa după cum s-a mai arătat, în afară de glicină, care nu are un atom de carbon asimetric, toți ceilalți aminoacizi au un atom de carbon asimetric și doi enantiomeri, iar izoleucina și treonina au câte doi atomi de carbon asimetrici și

câte patru enantiomeri. Numărul stereozomerilor posibili ai unui compus este 2^n , unde n reprezintă numărul de atomi asimetrici.

Activitatea optică este exprimată cantitativ ca rotație specifică $[\alpha]_D^{25}$:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\text{rotația observată, grade} \times 100}{\text{lungimea drumului optic, dm} \times \text{concentrația, g / 100 ml}}$$

Notă. Temperatura 25°C și lungimea de undă a luminii D , de obicei, linia D a sodiului $589,3 \text{ nm}$, trebuie specificate.

În tabelul 7.8. se prezintă rotația specifică a unor aminoacizi obținuți din proteine în soluție apoasă [1]. Se observă că unii aminoacizi obținuți din proteine sunt dextrogiri (notați cu semnul $+$) și alții sunt levogiri (notați cu semnul $-$).

Tabelul 7.8.

Rotația specifică a unor aminoacizi obținuți din
proteine în soluție apoasă

Aminoacidul	Rotația specifică $[\alpha]_D^{25}$
L-Alanină	$+1,8^0$
L-Arginină	$+12,5^0$
L-Leucină	$-11,0^0$
L-Izoleucină	$+12,4^0$
L-Fenilalanină	$-34,5^0$
L-Acid glutamic	$+12,0^0$
L-Histidină	$-38,5^0$
L-Acid asparagic	$-5,0^0$
L-Metionină	$-10,0^0$
L-Lizină	$+13,5^0$
L-Serină	$-7,5^0$
L-Prolină	$-86,2^0$
L-Treonină	$-28,2^0$
L-Triptofan	$-33,7^0$
L-Valină	$+5,6^0$

Pe baza datelor din tabelul 7.8., se poate afirma că rotația specifică a unui aminoacid depinde de structura radicalului R .

În figura 7.5. se observă că valoarea rotației specifice a unui aminoacid variază cu pH -ul la care se determină. În general, aminoacizii monoaminomonocarboxilici levogiri prezintă o rotație specifică maximă când sunt la pH -ul izoelectric.

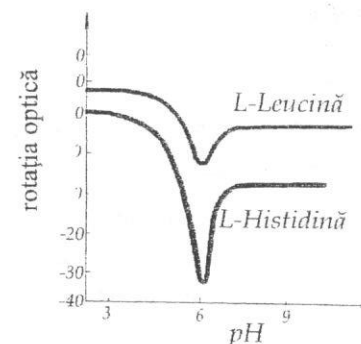


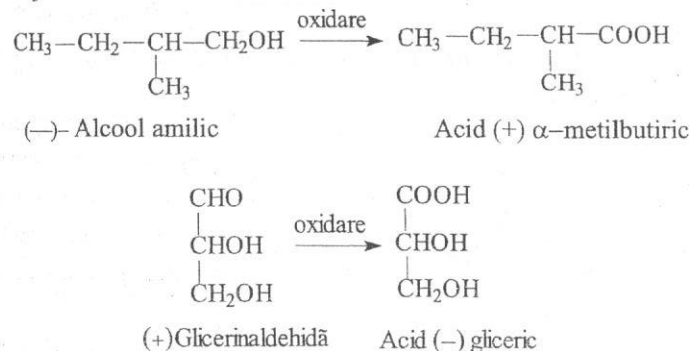
Fig.7.5. Variația rotației optice a aminoacizilor în funcție de pH [1].

7.4.1. CONFIGURAȚIA AMINOACIZILOR

Teoria stereochemică arată ce simetrie trebuie să aibă o moleculă pentru a exista sub formă de izomeri optic activi, fără a indica care din formele de configurație revine fiecăruia din izomerii optici.

Nu sunt reguli după care se poate prevedea sensul în care se rotește planul luminii polarizate pentru un compus cu o anumită configurație. De exemplu, prin oxidarea alcoolului amilic levogir se formează acid $(+)-\alpha$ -metilbutiric, iar prin oxidarea $(+)$ -glicerinaldehidei se formează acid $(-)$ -gliceric.

Oxidarea grupelor $-\text{CH}_2\text{OH}$ și $-\text{CH}_2\text{O}$ din acești compuși nu schimbă configurația atomului de carbon asimetric vecin, care nu ia parte la reacție.



Formarea unei sări poate schimba sensul rotației optice; sarea de sodiu a acidului (+)-lactic este levogiră, deși are aceeași configurație cu cea a acidului liber, care este dextrogir.

Cercetarea configurațiilor monozaharidelor a condus la stabilirea relațiilor ce există între acestea și configurația (+)-glucozei. (+)-Glucoza are patru atomi de carbon asimetrici și în consecință, structura sa este prea complicată pentru a servi ca standard pentru corelarea configurațiilor compușilor optic activi. De aceea, s-a propus pentru acest scop glicerinaldehida care are un singur atom de carbon asimetric.

S-a considerat (+)-glicerinaldehida drept configurația pe care o are grupa OH în partea dreaptă, atunci când molecula tetraedrică este orientată cu grupa CHO în sus și cu grupa CH₂OH în spate (Fig.7.6.); (-)-glicerinaldehidei îi revine firește formula enantiomorfă (imaginea de oglindire)

S-a observat că rotația optică a D-α-hidroxiacizilor suferă o deplasare spre dreapta când aceștia sunt transformați în esteri și o deplasare în același sens mai pronunțată, când sunt transformați în amine.

De aici rezultă, de exemplu, că acidul mandelic natural levogir are aceeași configurație ca acidul (-) lactic și ca acidul (-) gliceric și face deci, parte, ca și aceștia, din seria D. Aceeași configurație la grupa CHOH au și următorii compuși [2].

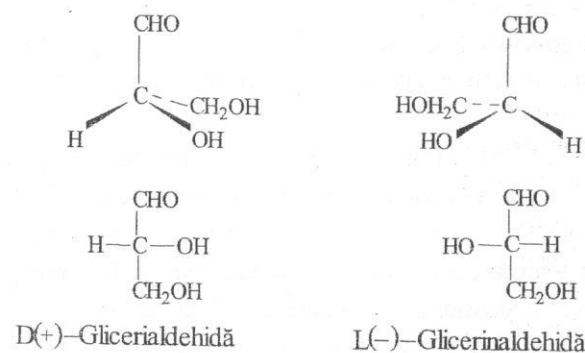


Fig.7.6. Formulele de configurație și de proiecție ale celor două glicerinaldehide enantiomere

Aplicată la un aminoacid, (+) alanina naturală, metoda comparației optice duce la concluzia că acest compus are aceeași configurație ca acidul L(+)-lactic, care este deci, L (+) alanina.

S-a stabilit prin metoda comparației optice că (+)-alanina naturală, obținută din proteine are aceeași configurație cu acidul (+)-lactic. Cum este dovedit, pe cale directă, că acest acid are aceeași configurație ca L-glicerinaldehida, rezultă că alanina naturală dextrogiră are configurație L.

Prin transformări chimice ce nu comportă substituții la atomul de carbon asimetric s-a determinat, pornindu-se de la (-)-serină, înrudirea configurativă a acestui aminoacid cu (-)-cisteina și cu (+)-alanina, ca și cu alți aminoacizi. S-a mai stabilit o înrudire configurativă similară între acidul L(-)-asparagic și următorii aminoacizi naturali: (-)-leucina, (+)-valina, (-)-metionina, (-)-treonina, (+)-ornitina, (+)-lizina, (-)-prolina, și acidul (+)-glutamic. Prin asemenea metode s-a ajuns la concluzia că majoritatea aminoacizilor naturali au aceeași configurație ca L-serina și L-alanina [2].

La formularea substanțelor optic active se folosesc simbolurile (+) sau (-) pentru a se arăta sensul de rotație și D și L, pentru a se evidenția înrudirea sterică cu configurația (+)- sau (-)-glicerinaldehidei: literele D și L se folosesc mai ales pentru a defini configurația compușilor care conțin atomi de

carbon asimetrici de tipul $RR'CHX$. Formula de proiecție se scrie cu catena principală $R-C-R'$ în poziție verticală, astfel ca grupa cea mai oxidată R să apară sus.

Izomerul cu configurația D corespunde formulei de proiecție în care substituentul X este scris la dreapta, iar izomerul cu configurația L corespunde formulei de proiecție în care substituentul X este scris la stânga (Fig.7.7.).

Când un compus conține doi sau mai mulți atomi de carbon asimetrici, s-a stabilit în mod convențional care dintre atomii de carbon asimetrici determină apartenența la una dintre cele două serii sterice, D și L.

Astfel, pentru aminoacizi, apartenența la seriile D sau L este hotărâtă de atomul de carbon asimetric vecin cu grupa carboxilică și de care este legată grupa NH_2 .

Monozaharidele se încadrează în seria D sau L după configurația atomului de carbon asimetric cel mai depărtat în catenă de gruparea carbonil.

Nu trebuie să se uite că această încadrare a compușilor optic activi și seriile sterice D și L nu decurge dintr-o necesitate logică, ci se bazează pe o convenție destinată unei mai bune clasificări și nomenclaturi a substanțelor [2].

Atunci când doi compuși optic activi cu structură similară, supuși unei transformări chimice analoage (esterificare, amidificare, hidroliză etc.), suferă o deplasare mare a rotației optice în același sens, acești compuși au probabil aceeași configurație, observație care se bazează pe metoda comparației optice.

Toți aminoacizii din proteine aparțin seriei stereochemice L.

Deși în proteine sunt prezenți numai L-aminoacizi, se găsesc numeroși D-aminoacizi în celule sub alte combinații chimice. De exemplu, se găsesc în pereții celulari ai unor microorganisme sau fac parte din structura antibioticelor peptidice (gramicidina, actinomicina).

Treonina obținută din hidrolizatele proteice este, convențional, numită L, dar imaginea ei în oglindă reprezintă forma D [1].

Ceilalți doi stereoizomeri ai săi sunt diastereoizomeri sau forme alo, care, de asemenea, sunt imaginea în oglindă a unuia față de celălalt (Fig.7.7).

Cistina, forma oxidată a cisteinei, conține doi atomi de carbon asimetrici și poate exista în formele L, D și mezo (un izomer în care atomii de carbon

asimetrici sunt imaginile în oglindă ale unuia față de celălalt) (Fig.7.7), dar care nu există în natură.

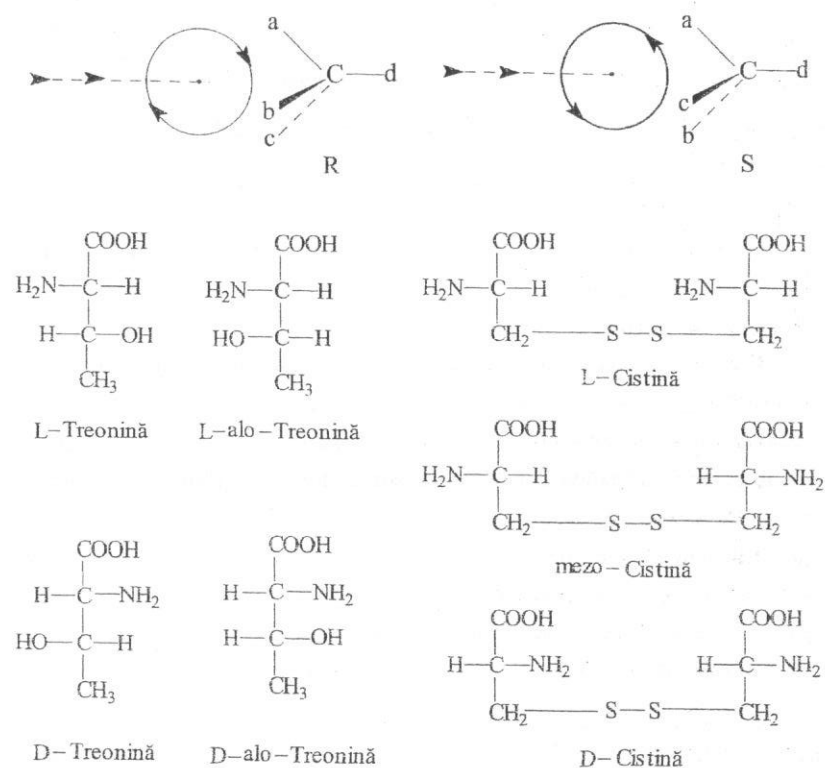


Fig.7.7.Stereoizomerii treoninei și ai cisteinei

Natura stereoizomerilor unor compuși ce conțin mai mulți atomi de carbon asimetrici poate duce la ambiguități și de aceea trebuie luat în seamă sistemul de notare a stereoizomerilor după convenția Cohn-Ingold-Prelog.

Datorită faptului că nu există o relație simplă între configurație și sensul de rotație a planului luminii polarizate, a devenit necesară introducerea unui mod univoc de notare a configurației moleculelor chirale.

Potrivit convenției R.S.Cahn, C.K. Ingold, V. Prelog, se stabilește întâi o ordine de prioritate a substituenților cu ajutorul unor reguli prezentate mai jos.

Se admite că cei patru substituenți, a, b, c, d, de la atomul de carbon asimetric corespund ordinei de prioritate descrescândă $a > b > c > d$. Semnul > se va citi: "are prioritate față de". Se privește molecula din partea opusă grupei cu prioritatea cea mai scăzută (în cazul de față d).

Dacă pornim din a (substituentul cu prioritatea cea mai avansată) către b și apoi către c obținem sensul de rotație al acelor ceasornicului, configurația atomului asimetric se notează cu R (de la *rectus* = dreapta, în limba latină); în caz contrar, notația folosită este S (*sinister* = stânga) (Fig. 7.7).

Principalele reguli pentru stabilirea priorității substituenților sunt următoarele:

1. Se iau în considerație numai atomii legați direct de atomul asimetric. Prioritatea substituenților scade în ordinea numerelor atomice ale acestor atomi. De exemplu, în $\text{H}_3\text{C}-\text{CHClBr}$, numerele atomice a celor patru atomi legați direct de atomul de carbon asimetric scad în ordinea $\text{Br} > \text{Cl} > \text{C} > \text{H}$. Ordinea de prioritate a substituenților este $\text{Br} > \text{Cl} > \text{CH}_3 > \text{H}$.
2. Dacă ordinea de prioritate a doi sau mai mulți substituenți nu poate fi stabilită cu ajutorul primei reguli, ținând seama de atomii direct legați de atomul de carbon asimetric, se trece la examinarea atomilor direct legați de aceștia.

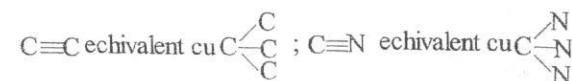
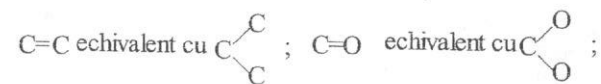
Fiecare dintre substituenți poate conține în acest strat unul sau mai mulți atomi.

Vom considera cazul, mai frecvent întâlnit, în care substituenții conțin în stratul al doilea câte trei atomi.

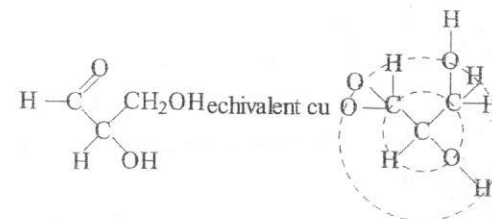
Ordinea de prioritate a doi substituenți ce conțin în acest strat atomii A, B, C, respectiv A', B', C' (ordinea numerelor atomice fiind: $A \geq B \geq C$; $A' \geq B' \geq C'$) se stabilesc astfel. Dacă $A > A'$, are prioritate substituentul care conține în acest strat atomul A. Dacă $A = A'$, dar $B > B'$, prioritatea este hotărâtă de atomul B; în cazul $A = A'$, $B = B'$, dar $C > C'$, prioritatea este impusă de atomul

C. Dacă nici astfel prioritatea nu poate fi stabilită se trece la următorul strat de atomi.

Legăturile duble și triple se tratează ca și cum atomul respectiv ar fi legat prin câte o legătură simplă de doi, respectiv trei atomi. Se consideră grupele:



Pentru exemplificare se va considera cazul gliceraldehidei:



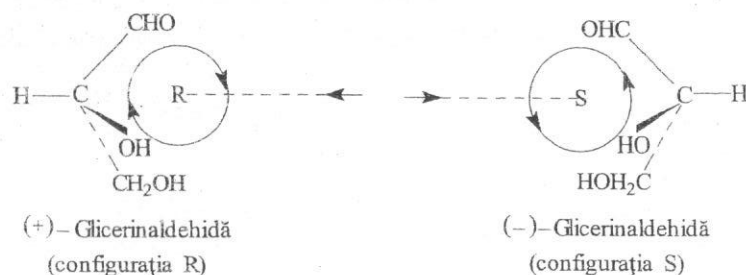
Atomii direct legați de atomul de carbon asimetric sunt: H, O, C. Numerele atomice scad în ordinea $\text{O} > \text{C} > \text{H}$, deci ordinea de prioritate a substituenților este: $\text{OH} > \text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CHO} > \text{H}$. Pe baza regulii 1 nu se poate hotărî prioritatea substituenților CH_2OH și CHO .

Ținând cont de regula 2, se compară următorul strat de atomi, adică O, O, H (corespunzând grupei CHO) cu O, H, H (din grupa CH_2OH : Prima pereche de atomi fiind identici (O și =), se compară următoarea pereche (= și H). În aceasta oxigenul are număr atomic mai mare decât hidrogenul, deci, grupa CHO va avea prioritate față de CH_2OH .

Ordinea de prioritate a substituenților în gliceraldehidă este deci: $\text{OH} > \text{CHO} > \text{CH}_2\text{OH} > \text{H}$.

Privind molecula din partea opusă atomului de hidrogen (substituentul cu prioritatea cea mai scăzută), se constată că (+)-gliceraldehida corespunde

configurației R, iar (–)-glicerinaldehida, configurației S [2]:



Această convenție de notare a configurației se aplică, în mod similar, și la substanțele cu doi sau mai mulți atomi asimetrici și poate fi extinsă și la cazurile de izomerie optică fără atomi asimetrici [2].

Separarea enantiomerilor. La hidroliza proteinelor se obțin frecvent aminoacizi racemici (un amestec echimolar al stereozomerilor D și L, care se simbolizează prin prefixul DL)

Prin sintezele de aminoacizi se obțin formele racemice, care sunt amestecuri echimoleculare de enantiomeri. În cazul aminoacizilor, care se comportă, în cele mai multe cazuri, ca acizi sau baze slabe, compușii racemici nu pot fi scindați cu ajutorul bazelor sau acizilor optic activi neformând săruri stabile, cristalizabile.

Face excepție acidul DL glutamic care este un acid destul de tare pentru a putea fi scindat prin intermediul sării sale de chinină.

Scindarea aminoacizilor racemici în enantiomeri se poate face prin acilarea lor la grupa aminică (de obicei formilarea), care le mărește mult aciditatea și formarea de săruri cu baze optic active.

Pentru separarea aminoacizilor în enantiomeri se pot folosi, de asemenea, o serie de metode biochimice. Astfel, se transformă, de exemplu, acidul DL-glutamic într-un ester și apoi acesta se hidrolizează cu enzime, ca papaina, chimotripsina, care atacă numai esterii formelor L. O altă metodă constă în hidroliza enzimatică cu acilaze sau carboxipeptidază a compușilor N-acilați ai DL-aminoacizilor; se obține L-aminoacidul alături de D-acilaminoacid.

7.5. BIOCHIMIA AMINOACIZILOR

Aminoacizii la animalele superioare sunt constituenți ai proteinelor necesare creșterii și refacerii țesuturilor și precursori ai multor biomolecule ca: enzime, hormoni, unele vitamine etc.

Aminoacizii servesc și ca sursă de energie când sunt ingerați în cantități mai mari decât sunt necesari pentru refacerea proteinelor uzate sau pentru creștere. În acest ultim caz sunt dezaminați, iar catena de atomi de carbon este convertită la glucoză (gluconeogeneză) sau oxidată la CO_2 , pe calea ciclului acizilor tricarboxilici. Amoniacul rezultat de la dezaminare este eliminat sub formă de uree sau acid uric.

La vertebratele, se oxidează cu ușurință atât aminoacizii din proteinele ingerate (exogeni), cât și aminoacizii din turnoverul proteinelor organismului propriu (endogeni).

La plantele superioare, organisme ce au tendința de creștere continuă, procesul de sinteză a aminoacizilor este prioritar.

Bacteriile nu oxidează sau oxidează puțin aminoacizii. Ele sunt mult mai active în sinteza aminoacizilor. Sunt și bacterii care degradează aminoacizii, mai ales când sunt singura sursă de carbon.

7.5.1. AMINOACIZII ÎN ALIMENTAȚIE

Vertebratele ingeră aminoacizii în primul rând sub formă de proteine. Proteinele, ca și peptidele, sunt hidrolizate până la aminoacizi de către enzimele proteolitice din tractul gastrointestinal, secretate de către stomac, pancreas și intestinul subțire, deoarece numai aminoacizii sunt cei care participă la diferite procese metabolice.

Digestia proteinelor începe în stomac, unde *pepsina* este principala enzimă proteolitică. Ea este secretată sub forma zimogenului *pepsinogen* de către celulele specializate ale mucoasei stomacale.

Pepsinogenul este convertit la pepsină, de însăși pepsina la pH-ul acid al sucului gastric, prin îndepărtarea a 42 de aminoacizi de la capătul N terminal al

lanțului său polipeptidic. Pepsina are o specificitate foarte largă, dar atacă de preferință legăturile peptidice la care participă resturi de aminoacizi aromatici, dar și metionina sau leucina, formând peptide mai mici și o cantitate foarte mică de aminoacizi liberi.

Sucul pancreatic care se varsă în intestinul subțire conține zimogenii: *chimotripsinogen*, *tripsinogen*, *procarboxipeptidazele A și B* și *proelastaza*. Chimotripsinogenul trece în chimotripsină activă prin îndepărtarea din molecula sa a două dipeptide, sub acțiunea tripsinei și a chimotripsinei libere.

Chimotripsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă aminoacizii aromatici, în dreptul grupei lor carboxil.

Tripsinogenul este convertit la tripsină activă de către *enterochinază*, prin îndepărtarea unui hexapeptid N-terminal.

Tripsina hidrolizează legăturile peptidice la care participă lizina și arginina, în dreptul grupei lor carboxilice.

Carboxipeptidaza A este o enzimă care conține Zn^{2+} și hidrolizează aproape orice tip de legături peptidice carboxilterminale. Carboxipeptidaza B scindează arginina sau lizina la C-terminal.

Proteinele ajunse în stomac sunt hidrolizate de pepsină, apoi în intestinul subțire, de enzimele secretate de pancreas, până la aminoacizi liberi și peptide mici, iar peptidele mici sunt hidrolizate la aminoacizi de peptidaze secretate de mucoasa intestinală și mai ales de *leucin aminopeptidaza*, o enzimă care conține Zn^{2+} și care eliberează aminoacizii N-terminali.

Aminoacizii trec din intestin în sânge și ajung în ficat, unde are loc cea mai mare parte a metabolismului lor, inclusiv degradarea [1].

Unii aminoacizi sunt indispensabili creșterii animalelor tinere și funcționării normale a organismului adult. Acești aminoacizi, numiți *esențiali* sau *indispensabili*, nu sunt sintetizați de organismul animal, ci sunt luați de către acesta din hrană.

Alți aminoacizi pot lipsi din hrană fără nici un inconvenient (tabelul 7.9.).

Unii aminoacizi esențiali pot fi înlocuiți în hrană cu alții. Tirozina se poate forma din fenilalanină, iar cisteina din metionină. Arginina este sintetizată în cantitate suficientă în organismul matur, nu însă și în organismul tânăr, în curs

de creștere sau slăbit de boală. Capacitatea de sinteză pentru diferiții aminoacizi variază cu specia animală.

Tabelul 7.9.

Aminoacizii esențiali și neesențiali pentru alimentație

Aminoacizi esențiali		Aminoacizi neesențiali
Neînlocuibili	Înlocuibili	
Valină		Glicină
Leucină		Alanină
Izoleucină		Acid asparagic
Fenilalanină	→ Tirozină	Acid glutamic
Treonină		Serină
Metionină	→ Cisteină (cistină)	Arginină
Lizină		Prolină
Triptofan		Hidroxi-prolină
Histidină		

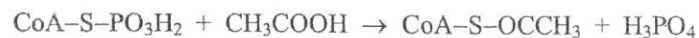
7.5.2. DEGRADAREA OXIDATIVĂ A AMINOACIZILOR

Aminoacizii din constituția proteinelor vertebratelor sunt degradați oxidativ prin secvențe enzimactice specifice fiecărui aminoacid. Toate aceste secvențe converg către câteva căi care duc la piruvat, acetyl-CoA sau intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici (Fig.7.8. și Fig.7.9.).

Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic are loc numai dacă este de față *coenzima acetilării*, numită *coenzima A*, codehidraza I și hidroderivatul ei (DPN-DPNH), sistemul acizilor adenzindifosforic și -trifosforic (ADP și ATP) și fosfat anorganic.

Coenzima care conține grupa SH, (CoA-SH), este coenzima unui mare număr de reacții la care participă grupa acetyl. Un intermediar esențial în decarboxilarea oxidativă este *acetyl-coenzima A*, care conține o grupă acetyl legată de sulf (CoA-S-OCCH₃). Coenzima A se combină cu ionul acetat în prezență de acid adenzintrifosforic.

Procesul decurge în două etape:



Acetil-coenzima A se formează și din acid piruvic, la decarboxilarea acestuia în țesuturile animale. În acest caz nu este nevoie de ATP, dar la reacție participă codehidraza I:



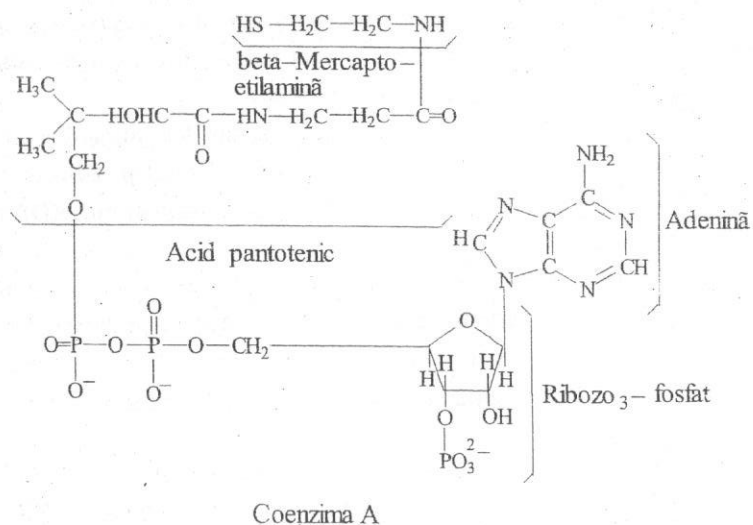
Acetil-coenzima A pune în libertate acetat, folosind totodată energia înmagazinată în legătura ei pentru a sintetiza acid adenozin-trifosfaric:



Însumând ecuațiile 1, 2 și 3 se obține ecuația globală (4):

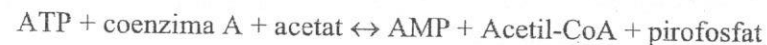


Coenzima A este o combinație cu masă moleculară mică, care se găsește în țesuturi și are în structura sa chimică acid pantotenic:

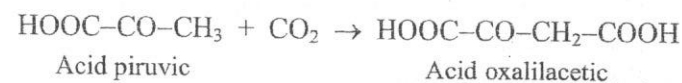


Funcția coenzimei A este de a transporta grupările acil la oxidarea enzimatică a piruvatului, la oxidarea enzimatică a acizilor grași, la acetilările biologice, la în sinteza acizilor grași. Coenzima A se scrie obișnuit "CoA" sau CoA-SH, pentru a se evidenția gruparea tiol.

Acetil-coenzima A (acetil-CoA) se formează la oxidarea enzimatică a piruvatului sau a acizilor grași; ea poate apărea și ca urmare a acțiunii acetil-CoA sintetazei asupra acetatului liber [1]:

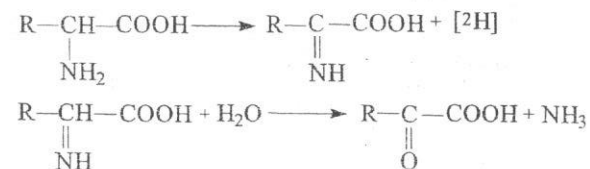


Acetil-CoA astfel formată poate să reacționeze enzimatic cu un acceptor de grupări acil. O a doua reacție esențială a acidului piruvic în țesuturile vii (în ficatul mamiferelor și în bacterii) este reacția de carboxilare, care duce la acidul oxalilacetic:



Între acidul oxalilacetic și acetilcoenzima A are loc o reacție de condensare la care participă grupa CH_3 a acetilului și în care se formează acid citric. Această succesiune de degradări este cunoscută sub numele de ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs). Acizii citric, α -cetoglutaric, fumaric și malic sunt componente normale ale tuturor celulelor vii. Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor, în toate celulele, vii decurge după ciclul lui Krebs a acizilor tricarboxilici (Fig.7.8.).

Eliminarea azotului din aminoacizi, sub formă de amoniac, este o reacție oxidativă ducând la acizi α -cetonici. Procesul decurge în două faze, din care prima este enzimatică și duce la iminoacizi, care reacționează repede cu apa și se pune în libertate amoniac:



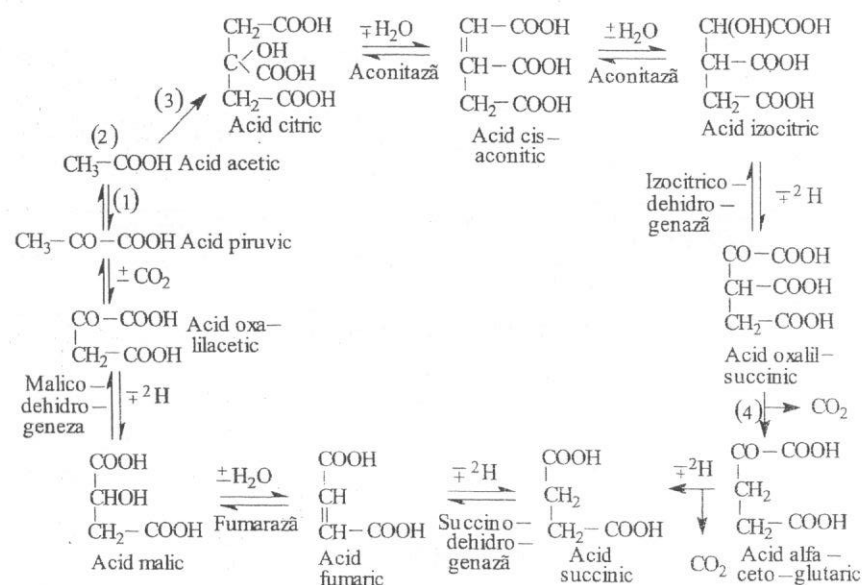


Fig.7.8. Ciclul acizilor tricarboxilici al lui Krebs și relațiile cu metabolismul glucidelor, grăsimilor și proteinelor.

Schema oxidării aminoacizilor. Așa după cum s-a arătat, aminoacizii din alcătuirea proteinelor sunt degradați oxidativ prin secvențe enzimactice diferite pentru fiecare aminoacid. Toate aceste secvențe converg până la sfârșit către câteva căi care duc la piruvat, acetyl-CoA sau intermediari din ciclul acizilor tricarboxilici al lui Krebs.

Conform figurilor 7.8. și 7.9., 11 aminoacizi sunt converțiți în final la acetyl-CoA, fie direct, fie pe calea piruvatului sau a acetoacetyl-CoA, cinci sunt converțiți la α -cetoglutarat, trei la succinil-CoA și doi la oxalilacetat.

Doi aminoacizi, fenilalanina și tirozina, sunt astfel degradați, încât o parte a scheletului lor de carbon intră în ciclul acizilor tricarboxilici, ca acetyl-CoA, iar cealaltă parte ca fumarat [1]. Se menționează că o parte din atomii de car-

bon nu intră în ciclul acidului oxalic, fiind pierduți pe drum din cauza reacțiilor de decarboxilare.

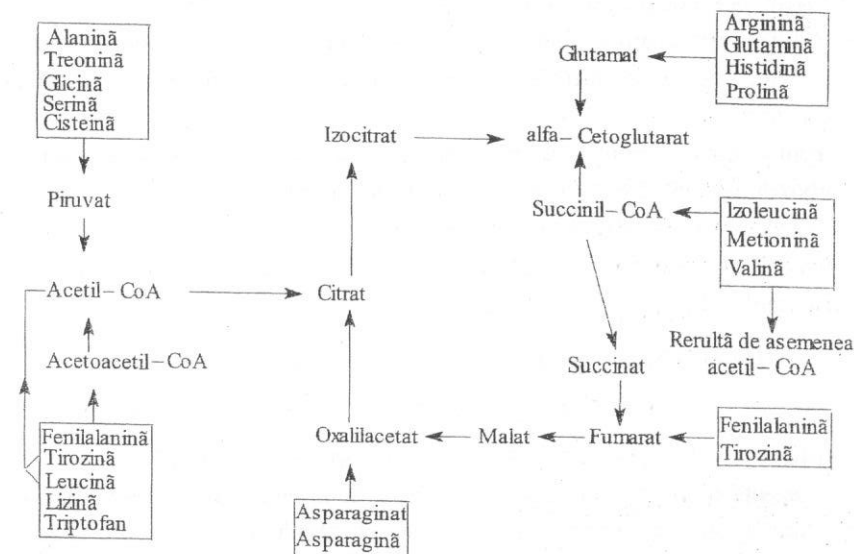


Fig.7.9. Căile prin care scheletul de atomi de carbon ai aminoacizilor intră în ciclul acizilor tricarboxilici.

Căile catabolice ale aminoacizilor sunt lungi și complexe, apar o serie de intermediari care îndeplinesc în celulă diferite funcții, în special de precursori pentru alte componente celulare. Catabolismul aminoacizilor se desfășoară, la vertebrate, mai ales în ficat și destul de mult în rinichi.

Atomii de azot din grupa α -amino, îndepărtați din aminoacizi în cursul degradării oxidative, sunt eliminați în urină sub formă de uree, amoniac sau acid uric, în funcție de specie.

În figura 7.9. s-au arătat punctele prin care scheletul de carbon al aminoacizilor poate intra în ciclul acizilor tricarboxilici.

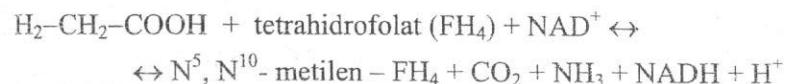
Punctul principal de intrare în ciclul acizilor tricarboxilici este acetyl-CoA; 11 aminoacizi intră prin acest punct. Dintre aceștia cinci sunt degradați la ace-

til-CoA pe calea piruvatului (alanina, treonina glicina, serina, cisteina), cinci pe calea acetoacetyl-CoA (fenilalanina, tirozina, leucina, lizina, triptofanul). Doi aminoacizi pot fi degradați și direct la acetyl-CoA (tirozina și leucina).

Aminoacizii, alanina, glicina, serina și cisteina care se degradează la piruvat pot fi convertiți la glucoză, deci sunt *glucogeni* sau sunt oxidați pe calea ciclului acidului citric.

Fenilalanina, tirozina, leucina, lizina și triptofanul intră în ciclul acizilor tricarboxilici pe calea acetoacetyl CoA și de aici la acetyl CoA.

Glicina poate fi degradată pe cale oxidativă, cu formare de CO_2 , amoniac N^5 , N^{10} - metilentetrahidrolat sub acțiunea glicinsintetazei, fără a se forma acetyl-CoA:



Notă. FH_4 = tetrahidrolat. Acidul folic este foarte răspândit în plante.

Prezența sa insuficientă duce, la animale, de la încetinirea creșterii la anemie. Acidul folic este format dintr-o pteridă substituită, acid p-aminobenzoic și acid glutamic (vezi Fig.7.10. care cuprinde structura acidului folic și tetrahidrolat).

Studii enzimactice și metabolice au arătat că, sub formă de coenzimă, acidul folic funcționează în transferul unor grupări cu un atom de carbon.

Acidul folic este precursorul acidului tetrahidrolat, coenzimă, care rezultă prin reducerea acidului folic. Tetrahidrolatul, notat cu FH_4 , este un transportor intermediar al grupărilor hidroximetil ($-\text{CH}_2\text{OH}$), formil ($-\text{CHO}$) sau metil ($-\text{CH}_3$), într-un mare număr de reacții enzimactice [1].

Fenilalanina, tirozina, leucina, lizina și triptofanul se degradează pe calea acetoacetyl-CoA și de aici la acetyl-CoA. Fenilalanina și tirozina sunt cetogeni, deoarece ei formează prin degradare acetylacetat liber.

O cale de degradare a glicinei este transformarea ei în serină de către *serin hidroximetiltransferaza*, o enzimă cu piridoxal-fosfat; serina este apoi deshidratată și dezaminată la piruvat, de către serin-dehidratază, care conține, de asemenea, piridoxal-fosfat [1].

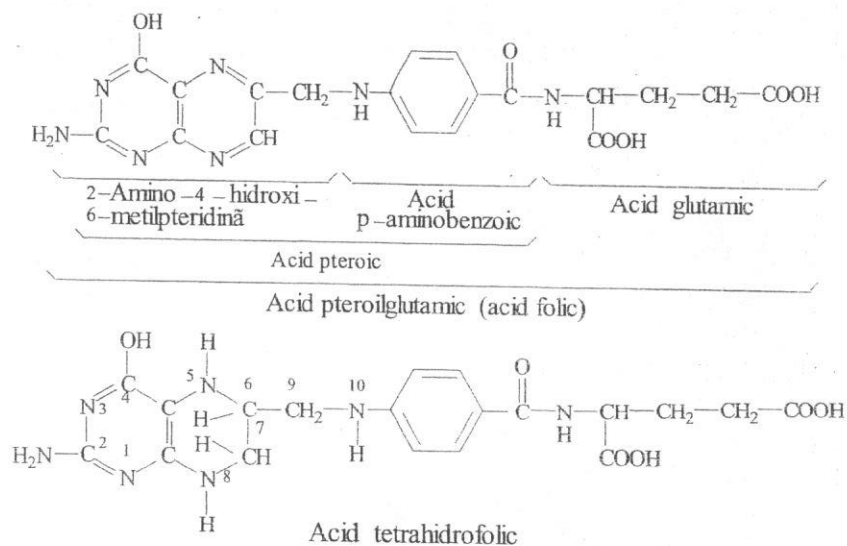
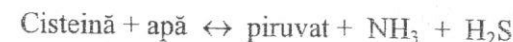


Fig.7.10. Acidul folic și acidul tetrahidrolat

Cisteina poate fi degradată pe mai multe căi, dintre care se menționează conversia ei la piruvat:



reacție catalizată de *cistationin-γ-liază*.

Fenilalanina, tirozina, leucina, lizina și triptofanul se degradează pe calea acetoacetyl-CoA și de aici la acetyl-CoA. Fenilalanina și tirozina sunt cetogeni, deoarece ei formează prin degradare acetylacetat liber, care poate fi activat cu succinil-CoA și rezultă acetoacetyl-CoA.

Printr-un proces enzimatic complex [1] rezultă acid fumaric, o nouă cale de intrare în ciclul acizilor tricarboxilici. Deci, fenilalanina și tirozină sunt nu numai cetogeni ci și glucogeni.

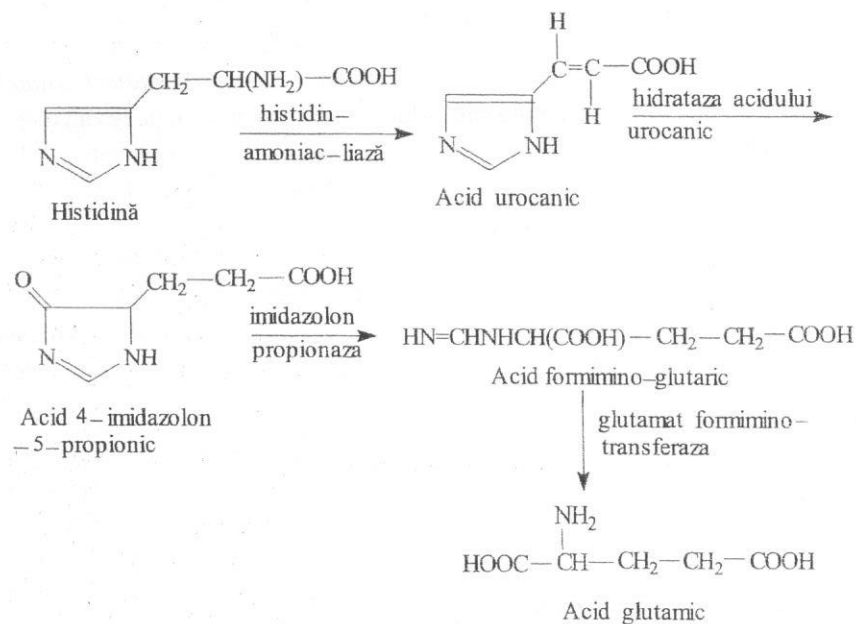
Dintre enzimele care catalizează transformări ale fenilalaninei este și *fenilalanin-4-mono-oxigenaza*, numită și *fenilalanin hidroxilaza*, care catalizează încorporarea unui atom de oxigen în molecula fenilalaninei și transformarea sa în tirozină.

La unii oameni este absentă fenilalanin hidroxilaza, ceea ce face ca fenilalanina să fie transaminată cu acid α -cetoglutamic cu formare de acid fenilpiruvic, care se acumulează în sânge și se elimină prin urină.

La copii, fenilpiruvatul aflat în exces în sânge, afectează dezvoltarea normală a creierului, provocând grave înapoieri mintale. Alimentarea unor astfel de copii cu regimuri lipsite de fenilalanină previne înapoierea mintală.

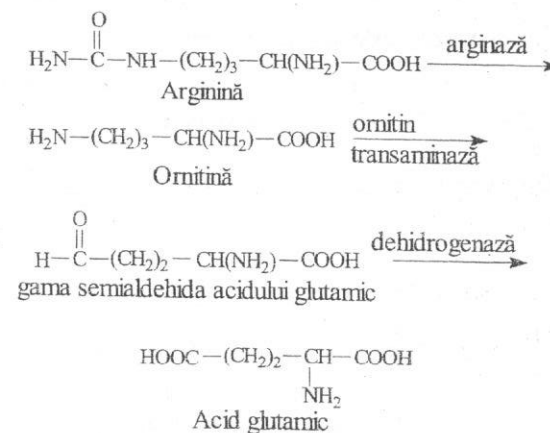
Aminoacizii fenilalanina și tirozina pot fi converțiți și la fumarat și apoi la acetato-acetil-CoA și acetil-CoA. Leucina poate fi convertită și direct la acetil-CoA, ca și izoleucina, treonina și triptofanul.

Histidina se oxidează la acid glutamic prin deschiderea ciclului imida-zolic cu formarea acidului N-formiminoglutamic, un intermediar care conține grupa formimino ($\text{HN}=\text{CH}-$) ce este îndepărtată de o enzimă care folosește ca acceptor al grupării cu un atom de carbon a tetrahydrofolatului (FH_4):

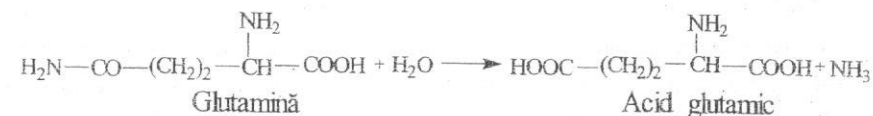


Arginina, histidina, glutamina, acidul glutamic și prolina întra în ciclul acizilor tricarboxilici pe calea cetoglutaratului; toți acești aminoacizi sunt glucogeni.

Arginina, în ficatul mamiferelor, este transformată de către *arginază* în ornitină, care la rândul său este convertită de către *ornitin-transaminază* la semialdehida acidului glutamic și în sfârșit la acidul glutamic de către *dehidrogenază*:

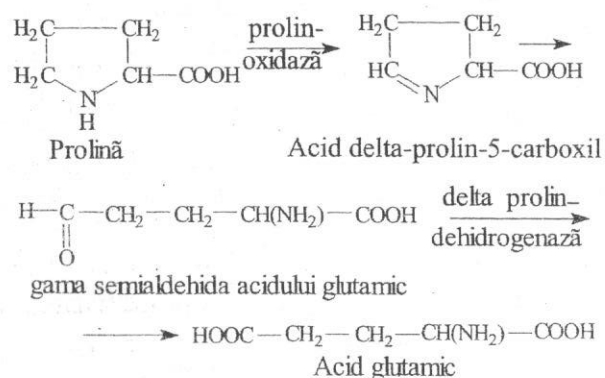


Glutamina este hidrolizată la acid glutamic de către *glutaminază* mai ales în rinichi:

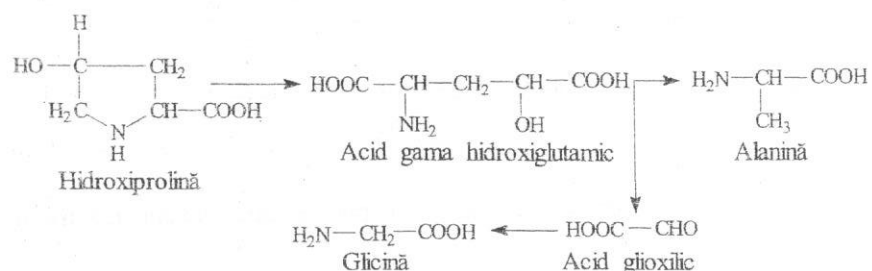


Transformarea glutaminei în acid glutamic poate fi catalizată și de *glutamat sintetaza*.

L-Prolina este dehidrogenată, se produce deschiderea ciclului pirolidinic și se formează semialdehida acidului L-glutamic, care este redusă la acidul L-glutamic:



Hidroxiprolina este transformată în acid γ -hidroxiglutaric și acesta în alanină și glicină:

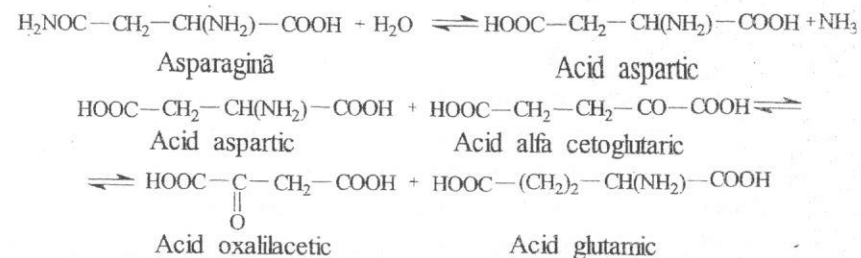


Aminoacizii metionina, izoleucina și valina sunt degradați prin intermediul *propionil-CoA* și *metilmalonil-CoA* la succinil-CoA, care este deacilat rezultând succinat. Acești amino-acizi sunt glucogeni [1].

Aminoacizii asparagina și acidul aspartic sunt degradați la oxalilacetat.

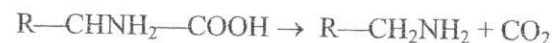
Asparagina este mai întâi hidrolizată la acid aspartic și amoniac de către *asparaginază*, enzimă larg răspândită în plante și animale.

Acidul aspartic este transaminat cu acidul α -cetoglutaric, formându-se acidul oxalilacetic:

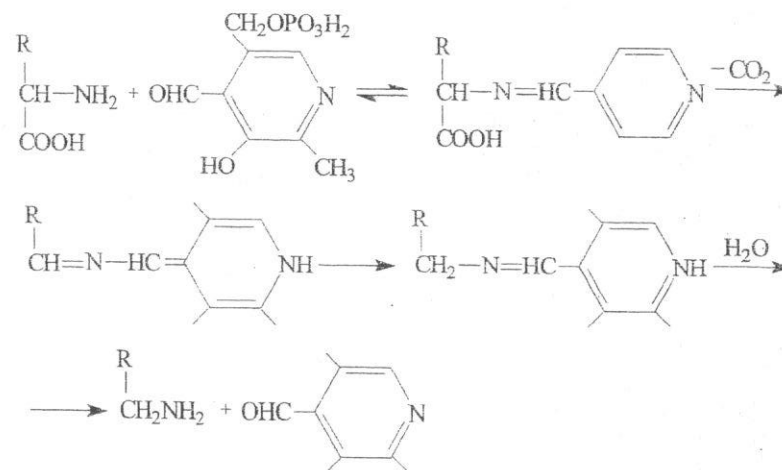


7.5.3. DECARBOXILAREA AMINOACIZILOR DE CĂTRE MICROORGANISME

A. *Decarboxilarea*. *Bacterium Coli*, *Bacterium subtilis*, transformă aminoacizii în aminele primare corespunzătoare:

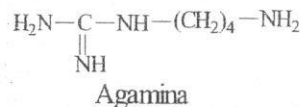
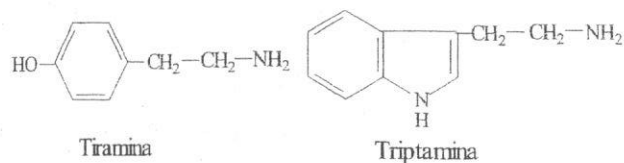
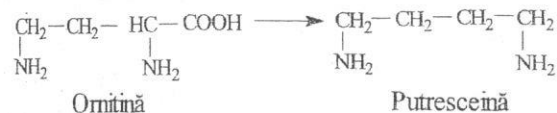
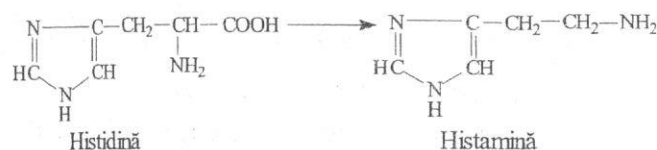


Enzimele care determină aceste reacții sunt *aminoacid-decarboxilazele*, specifice pentru fiecare aminoacid. Multe dintre aceste reacții enzimatice au loc în prezența unei coenzime, codecarboxilaza (fosfatul de piridoxal):

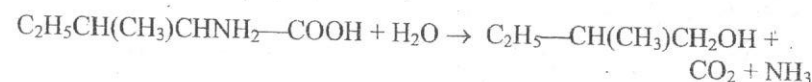
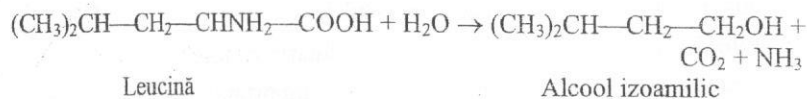


Dintre aminele primare care iau naștere în reacțiile de decarboxilare ale α -aminoacizilor, numite și amine biogene, se menționează *histamina* provenită din *histidină*, *putresceina* din *ornitină*, *cadaverina* din *lizină*, *tiramina* din *tirozină*, *agmatina* din *arginină* și *triptamina* provenită din *triptofan*. De exemplu, histidina este decarboxilată de *histidin carboxilaza*, formându-se histamină, un vasodilatator ce se găsește în unele țesuturi, ca rezultat al unei inflamații sau al unei hipersensibilități alergice:

B. Dezaminarea și decarboxilarea simultană a aminoacizilor de către drojdia [2].

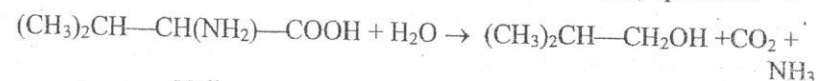


Drojdia, în mediul de fermentație alcoolică transformă aminoacizii în alcooli primari. Din leucină se formează alcoolul izoamilic, din izoleucină alcoolul amilic optic activ, iar din valină alcoolul izobutiric:



Izoleucină

Alcool amilic, optic activ

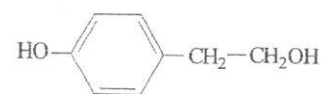


Valina

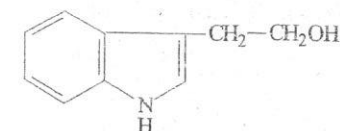
Alcool izobutiric

Acești alcooli se găsesc în coada de la distilarea alcoolului etilic industrial și provin din proteinele care se găsesc în materia primă supusă fermentației.

Drojdia de bere acționează asupra tuturor α -aminoacizilor. Astfel, de exemplu, din tirozină se formează alcool p-hidroxifenil-etilic (tirosolul), iar din triptofan rezultă alcoolul β -indoliletic (triptofolul):

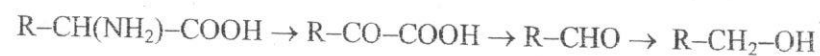


Tirosol



Triptofol

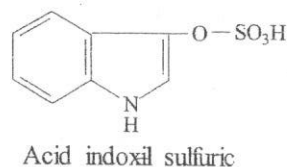
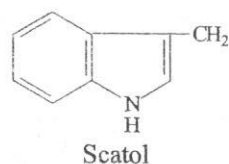
La degradarea aminoacizilor de către drojdie se produce, probabil, mai întâi o dezaminare până la acidul α -ceton, apoi acesta este decarboxilat de carboxilaza din drojdie și redus după calea normală a fermentației alcoolice:



În intestinul gros, sub acțiunea bacteriilor de putrefacție, aminoacizii suferă transformări mai profunde. Astfel, prin oxidarea catenei laterale a tirozinei rezultă p-crezolul și fenolul ce se găsesc în excremente.

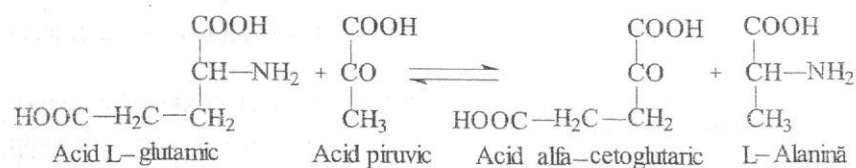
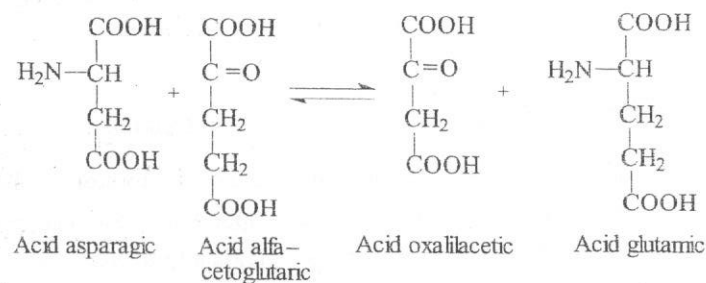
Triptofanul, pe aceeași cale, se transformă în scatol (β -metilindolul) și indol, substanțe ce determină mirosul fecalelor.

Triptofanul prin oxidare pe cale biochimică se transformă în indoxil, care în parte se elimină prin urină sub formă de acid fenilsulfuric:



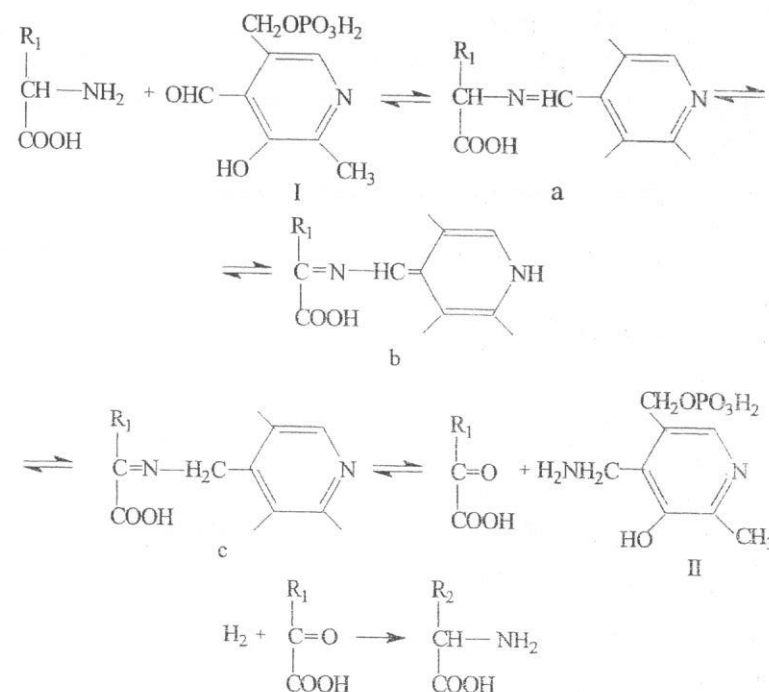
7.5.4. TRANSAMINAREA AMINOACIZILOR

La cel puțin 12 aminoacizi (alanina, arginina, asparagina, acidul asparagic, cisteina, izoleucina, leucina, fenilalanina, triptofanul, tirozina, valina) gruparea α -aminică poate fi tranferată enzimatic la atomul de carbon α al unui α -ceto-acid, care de obicei este acidul α -cetoglutamic sau piruvic:



Enzimele care catalizează tranferul unei grupe amino de la un aminoacid la un α -ceto-acid pentru a forma un nou aminoacid se numesc *transaminaze*. Transaminazele sunt mult răspândite în țesuturile animale și vegetale și în microorganisme. Reacția de transaminare necesită și participarea unei coenzime, *cotransaminaza*, reprezentată prin sistemul piridoxal-piridoxamină sub formă de fosfați.

Transformările care au loc în reacțiile de desaminare pot fi formulate astfel:



Fosfatul pirixoxalului (I) formează cu aminoacidul o bază Schiff; una din formele tautomere a, ale bazei Schiff care dă prin hidroliză, alături de acidul cetonc, fosfatul piridoxaminei (II). Acesta reacționează cu un alt acid α -cetonc care va fi transformat, printr-un șir re reacții, într-un nou aminoacid., regenerându-se totodată fosfatul piridoxalului [2].

Reacția de transaminare este calea principală pentru sinteza aminoacizilor în organisme vii. Reacția poate conduce la orice aminoacid dacă este prezent acidul α -cetonc corespunzător. În celulele vii sunt mult răspândiți trei acizi α -cetonici: acidul piruvic, acidul α -cetoglutamic și acidul oxalil-acetic.

Acidul glutamic este unul din cei mai importanți donori de grupe NH₂ în sinteza aminoacizilor, iar transaminazele, care catalizează reacțiile de transami-

nare de la acest aminoacid la diverși acizi cetonici sunt foarte răspândite.

Pe de altă parte, acidul α -cetoglutaric poate accepta grupe NH_2 de la aproape toți α -aminoacizii naturali, pentru a trece în acid glutamic.

Acidul glutamic se mai poate forma prin aminarea directă a acidului α -cetoglutaric sub acțiunea dehidrogenazei L-glutamice. Amoniacul necesar provine din dezaminarea oxidativă a aminoacizilor din proteinele proprii sau a proteinele din hrană [2].

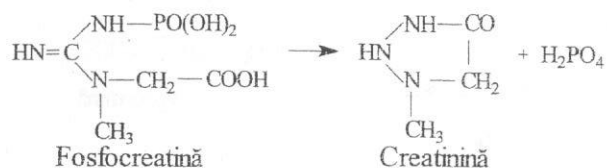
7.6. AMINOACIZI MAI IMPORTANȚI ȘI DERIVAȚII LOR

Glicocolul sau glicina, acidul aminoacetic, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, se găsește în toate proteinele în cantități mari.

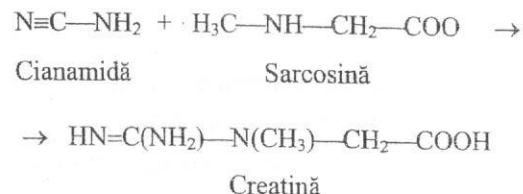
Sarcosina, N-metilglicocolul, $\text{H}_3\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, este componentul de bază al creatinei și se obține prin hidroliză din aceasta.

Creatina, $(\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COOH})$, se găsește în mușchii vertebratelor, sub formă de fosfocreatină, din care se extrage cu apă caldă.

Fosfocreatina, ca sursă de resturi de fosfat, joacă un rol deosebi în contracția musculară. Fosfocreatina, în condiții biologice, trece în creatinină prin pierderea unei molecule de acid fosforic:



Pe cale de sinteză, creatina se obține din sarcosină și cianamidă:



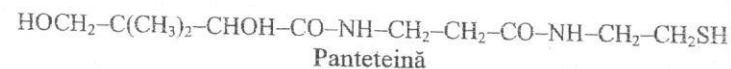
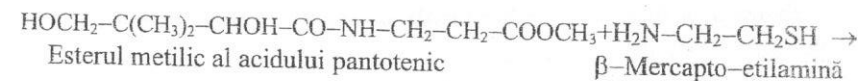
Derivați N-acilați ai glicocolului se găsesc în natură. Unul dintre aceștia este acidul glicolic ($\text{R}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), care este compusul N-acilat al glicocolului cu cel mai important dintre acizii biliari, acidul colic.

Benzoilglicocolul (acidul hipuric), $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ se găsește în urina mamiferelor ca urmare a proceselor de detoxicare a acizilor aromatici. Prin transformare în acid hipuric a acidului benzoic introdus accidental în organism sau provenit din oxidarea fenilalaninei devine inofensiv.

L(+)-Alanina, acidul α -aminopropionic, $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$, se găsește în toate proteinele. Se formează din acidul piruvic prin transaminare.

β -Alanina, acidul β -aminopropionic, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ se găsește în natură, dar nu în proteine.

Acidul pantotenic este o vitamină necesară creșterii animalelor și dezvoltării unor bacterii. Acidul pantotenic intră în constituția panteteinei care intră în molecula coenzimei A. Panteteina a fost sintetizată din esterul metilic al acidului pantotenic și β -mercapto-etilamină [2]:



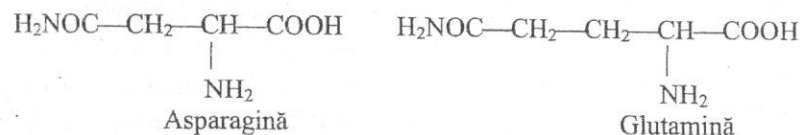
Panteteina este un factor de creștere pentru microorganisme mult mai eficient decât acidul pantotenic.

Acidul asparagic [$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$] și acidul glutamic [$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CHNH}_2)-\text{COOH}$], acizi dicarboxilici mult răspândiți în proteine. Prin hidroliză enzimatică, alături de acizii asparagic și glutamic, se obțin și monoamidele lor, asparagina și glutamina, în care sunt amidificate grupele aminice din resturile laterale.

Asparagina și glutamina joacă un rol important ca rezervă de amoniac la sinteza aminoacizilor în organism.

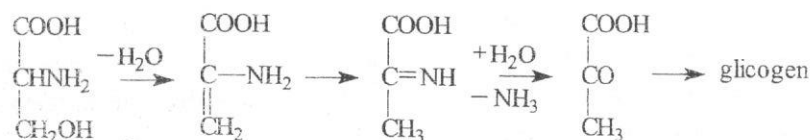
Glutamina a fost identificată în cantități mari în țesuturi și în sânge. Ea este sintetizată în țesuturi când acestea conțin amoniac în exces și este hidro-

lizată pentru a pune în libertate amoniacul necesar sintezei aminoacizilor. Ambii aminoacizi se găsesc în stare liberă și în plante.



Serina, acidul β -hidroxialfa-aminopropionic, $[\text{OH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$, se găsește în toate proteinele și a fost izolată, prima dată, din mătase.

Serina este dezaminată, în ficat, de desaminaza serinei, care acționează probabil în felul următor, cu remarcă că numai prima fază este enzimatică [2]:



Tirozina, acidul β -(p-hidroxifenil)- α -aminopropionic, $[\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$, se găsește în toate proteinele. În alimentație, tirozina poate fi înlocuită de fenilalanină care, în organismul animal se transformă ireversibil în tirozină.

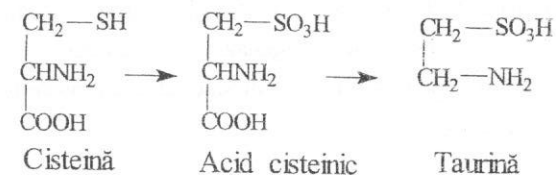
În organismul animal, tirozina este precursorul hormonilor adrenalina și tiroxina, a unor alcaloizi și a altor compuși aromatici.

Tirozina catalizează formarea melaninei, pigmentul negru-brun din piele și păr. Absența tirozinei împiedică formarea melaninei care duce la albinism.

Cisteina și cistina. Cistina, acidul di- α -amino- β -tiopropionic, $[\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$, se găsește în unele proteine. Cisteina, acidul α -amino- β -tiopropionic, $[\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$, ia naștere la hidroliza unor proteine și se transformă ușor prin oxidare în cistină care este greu solubilă și deci ușor izolabilă.

Cistina trece în cisteină prin reducere.

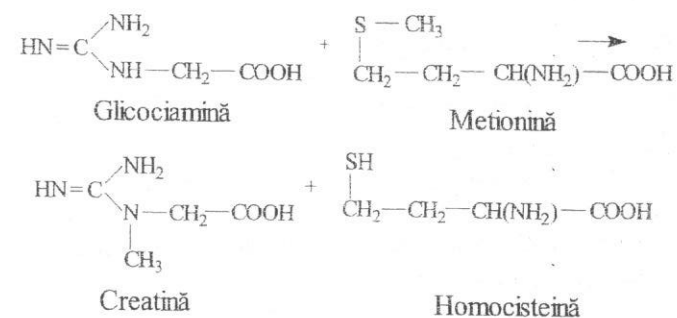
Taurina, acidul aminoetansulfonic, $[\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2]$, se formează în organism din cisteină prin oxidare și decarboxilare:



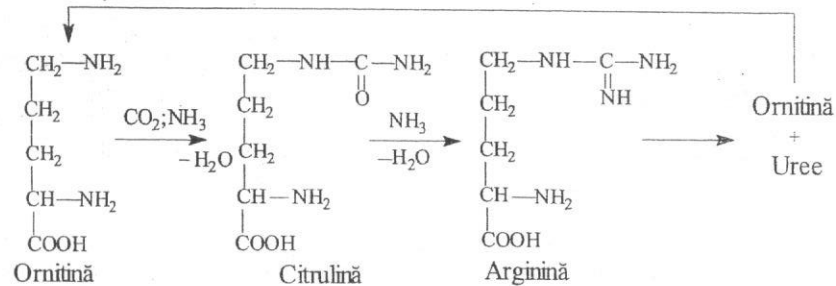
Taurina se găsește în mușchii vertebratelor și în fiere legată amidic de acidul colic ca acid taurocolic.

Metionina, acidul γ -metiltio- α -aminobutiric, $[\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$, se găsește în cele mai multe proteine. În organism îndeplinește funcția de transmetilare, cedând grupa metil și transformându-se în homocisteină. Astfel este procesul biologic de formare a creatinei din acidul guanidino-acetic (glicociamină) [2].

Homocisteina se remetilează cu grupe metil cedate de colina sau de betaína din hrană, regenerând metionina:

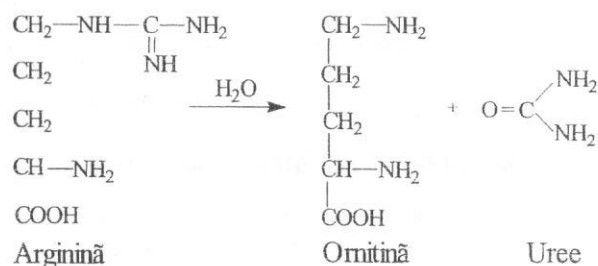


Ornitina, acidul α,δ -diaminovalerianic, $[\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2]$, nu este o componentă a proteinelor în care se găsește sub formă de arginină, acid δ -guanidino- α -aminovalerianic, $[\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2]$.

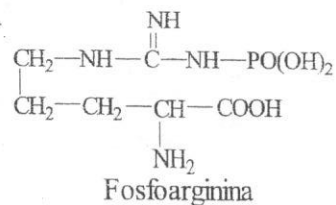


La hidroliza proteinelor, pe cale chimică, rezultă ornitină care provine din arginină [2].

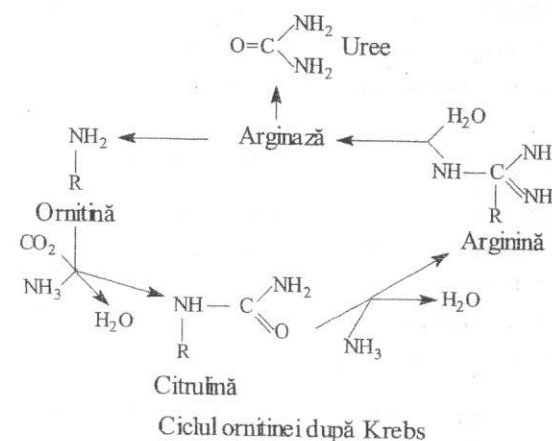
Arginina trece în ornitină și uree prin hidroliză bazică:



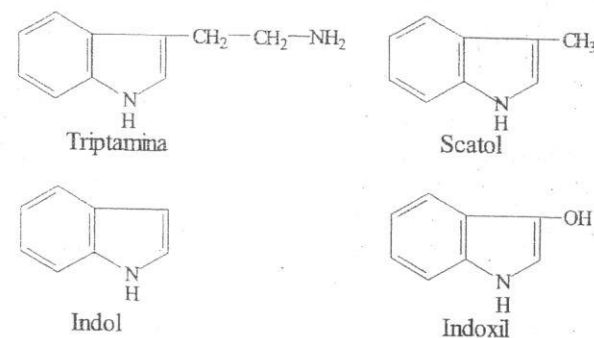
Mușchii nevertebratelor conțin *fosfoarginina* (acid arginin-fosforic) care este analog fosfocreatinei și îndeplinește aceeași funcție ca fosfocreatina în mușchii vertebratelor.



În ficatul mamiferelor arginaza catalizează hidroliza argininei în uree și ornitină (Kossel ; Krebs; C.D.Nenițescu).



Triptofanul, β -indolilalanină, se găsește în numeroase proteine; este un aminoacid esențial și participă la sinteza multor compuși deosebit de importanți din punct de vedere fiziologic. În intestinul gros, ia naștere triptamina prin decarboxilare, sub acțiunea bacteriilor de putrefacție. Degradarea bacteriană mai avansată duce la scatol, apoi la indol și la indoxil.



În natură, există un număr mare de aminoacizi, care nu se găsesc în proteine, ci în diferite microorganisme și materiale vegetale. Dintre aceștia se menționează: acidul γ -metilenglutamic și γ -metilenglutamina ce se găsesc în

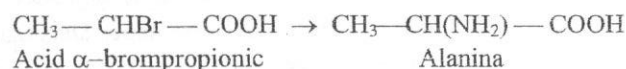
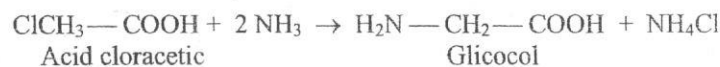
alunele de pământ, acidul γ -metilglutamic prezent în diferite specii de ferigi, acidul γ -aminobutiric, ca și L- homoserina mult răspândiți în plante, aliina ce se găsește în usturoi și mulți alți aminoacizi neproteici.

7.7. SINTEZE DE AMINOACIZI

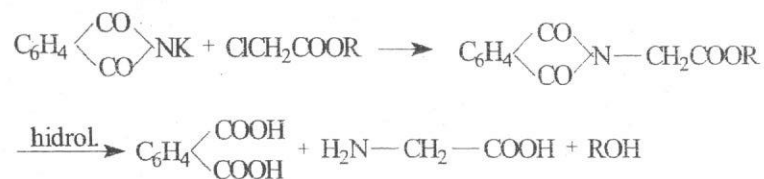
Aminoacizii sunt necesari la obținerea unor preparate pentru studii biologice, pentru obținerea de polipeptide, unii aminoacizi sunt folosiți în medicină sau se adaugă în produse alimentare.

Sinteze de aminoacizi se fac prin diferite metode chimice, dintre care se vor prezenta cele mai importante.

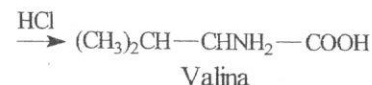
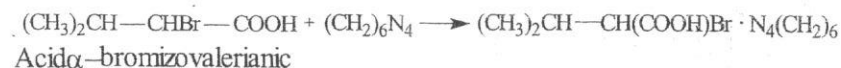
1. *Aminarea acizilor halogenați.* Reacția acizilor halogenați cu amoniacul este o metodă generală de preparare a aminoacizilor alifatici:



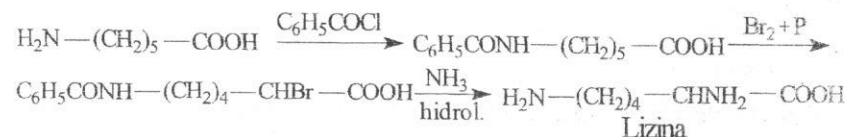
Pentru sinteza aminoacizilor se poate porni și de la ftalimida potasică pornindu-se de la esterii acizilor α -halogenați [2]:



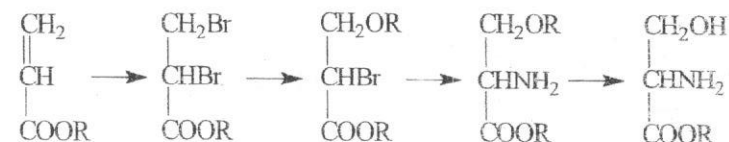
Aminarea acizilor α -halogenați se poate realiza și cu hexametilentetramină, care formează cu acești acizi un aduct ce se descompune prin încălzire cu acid clorhidric dând aminoacidul, cu un randament mare [2]:



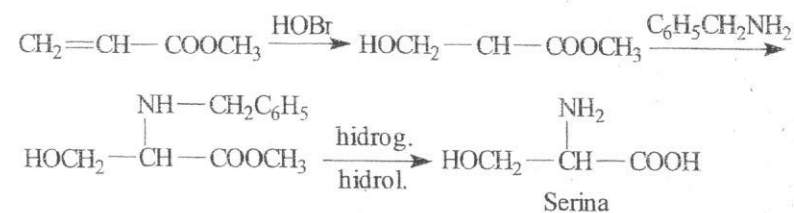
Lizina se prepară din acidul ϵ -aminocapronic:



Serina a fost sintetizată din esterul acidului acrilic:

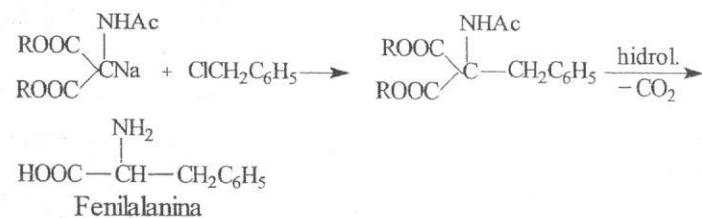


O altă cale de sinteză a serinei constă în condensarea bromhidrinei acrilatului de metil cu benzilamină [2]:

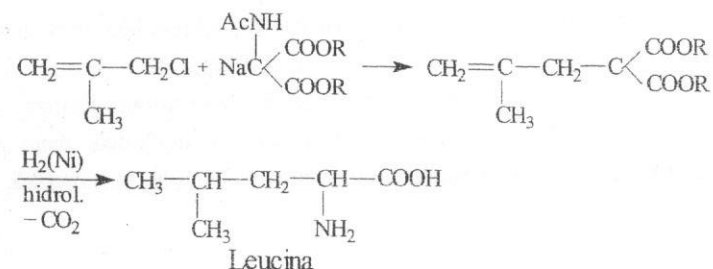


2. *Metode pornind de la esterul aminomalonic.* Se utilizează esterul aminomalonic N-acetilat (esterul acetamidomalonic), esterul aminomalonic N-formilat sau esterul aminomalonic N-benzoilat.

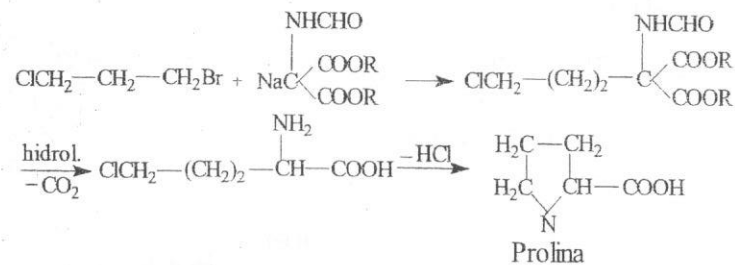
Alanina, valina, leucina și fenilalanina pot fi sintetizați prin condensarea esterului N-acetilamino-malonic sodat cu compuși halogenați adecvați și hidroliză ulterioară:



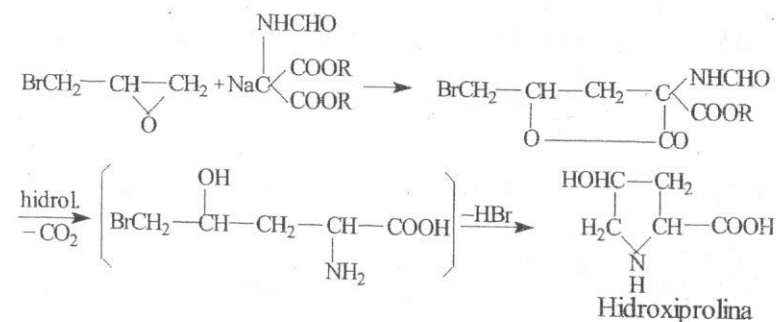
Leucina a fost obținută prin condensarea esterului N-acetilamino-malonic sodat cu clorură de metalil:



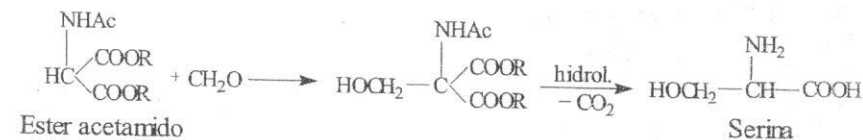
Prolina s-a sintetizat prin condensarea esterului formamidomalonic cu 1-clor-3-brompropan:



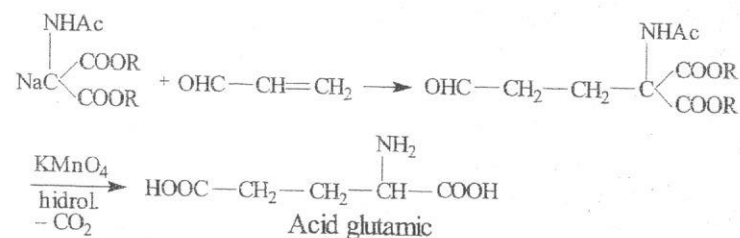
Hidroxirolina s-a sintetizat pe aceeași cale ca și prolina, pornindu-se de la epibromhidrină:



Serina se poate sintetiza din esterul acetamido-malonic prin condensare cu formaldehidă:



Acidul glutamic se poate obține din produsul de adiție al acroleinei la esterul acetamido-malonic:

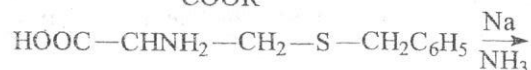
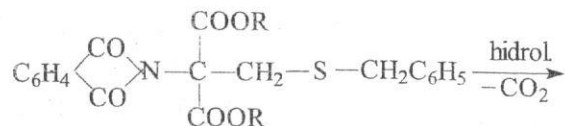
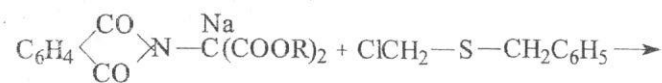


Cistina a fost sintetizată din clor metil-benzil-sulfură prin condensare cu ester ftalimido-malonic și apoi hidroliză, iar restul benzil se elimină prin reducere cu sodiul metalic. Rezultă astfel cisteina care prin oxidare trece ușor în cistină.

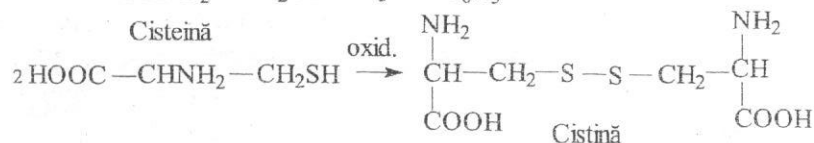
Clor metilbenzen-sulfura se obține pe o cale analoagă sintezei eterului clormetilic:



Sinteza cistinei se desfășoară conform reacțiilor:

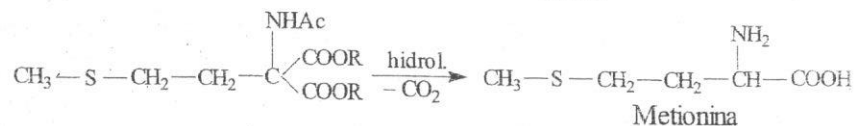
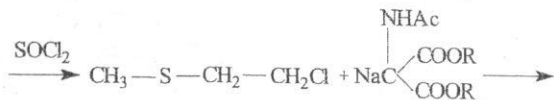
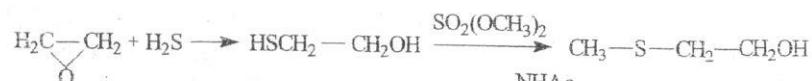


Cisteină



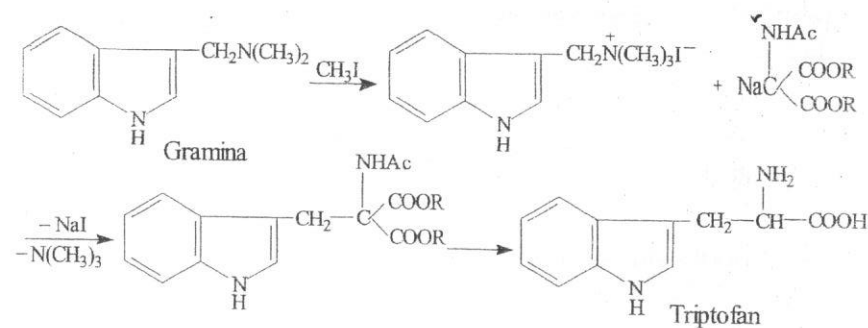
Cistină

La sinteza metioninei se pornește de la metil-β-cloretil-sulfură:

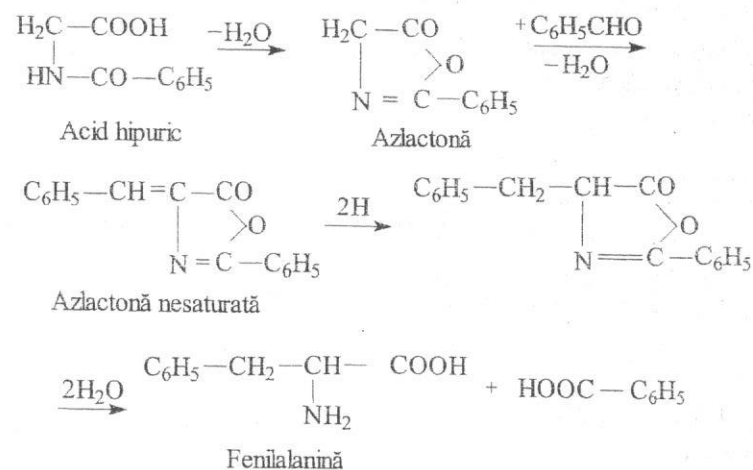


Metionina

Triptofanul s-a sintetizat pornindu-se de la gramină, un compus ce se obține din indol prin sinteză Mannich. Sarea cuaternară a graminei se comportă față de esterul acetamido-malonic ca un compus halogenat [2]:



Se pot realiza sinteze de aminoacizi, bazate pe metode de condensare Perkin, pornindu-se de la azlactone. Metoda Perkin constă în condensarea aldehydelor cu acizii organici și cu derivații lor. Aldehidele aromatice se condensează cu acidul benzoil-aminoacetic (acidul hipuric) în prezența anhidridei acetice. Acidul hipuric suferă o reacție de ciclizare intramoleculară și se formează o azlactonă. Aceasta se condensează cu aldehidele dând azlactone substituite, care, prin hidrogenare, cu amalgam de sodiu și hidroliză, se transformă în α-aminoacizi [2]:



Metoda prezentată se aplică la sinteza aminoacizilor cu nuclee aromatice

sau heterociclice conținând restul alaninic $-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$. Astfel, s-au obținut: tirozina, pornindu-se de la p-hidroxibenzaldehida, triptofanul, de la β -aldehida indolului și histidina, de la aldehida imidazolului.

În literatura de specialitate, sunt prezentate numeroase căi de sinteză a aminoacizilor: prin tratarea aldehydelor cu acid cianhidric și amoniac (în practică, de fapt, cu cianură de sodiu sau potasiu și amoniac) se obțin nitrili α -aminoacizilor care se supun apoi hidrolizei pentru obținerea aminoacizilor; metode bazate pe condensări Perkin; metode bazate pe reducerea derivaților funcționali azotați ai acizilor α -cetonici etc.

Separarea, purificarea, analiza calitativă și cantitativă a aminoacizilor se face frecvent prin cromatografia pe hârtie, pe coloană cu schimbători de ioni și prin cromatografia în fază gazoasă, chiar și când mediul supus analizei conține cantități mici din acești compuși.

Cromatografia pe hârtie descendentă, ascendentă sau circulară este una din metodele des folosite în analiza aminoacizilor din amestecuri sau mediile naturale prin diferite procedee, care se diferențiază mai ales prin sistemele de dizolvanți, reactivi de culoare și hârtie cromatografică.

Astfel, se pot separa aminoacizii liberi și legați, prin metodele existente în literatura de specialitate, din hidrolizatele proteice, din virusuri, bacterii, din plantele de cultură (orez, grâu, porumb, fasole, roșii, mazăre etc.), din țesuturile și organele animale (creier, ficat, splină, pancreas, rinichi, plămâni, glande cu secreție internă etc.), din lapte, brânză, ouă etc.

Cromatografia pe coloane schimbătoare de ioni se utilizează la analiza calitativă și cantitativă a aminoacizilor din hidrolizatele proteice, din amestecuri sau medii naturale în cele patru grupe principale (bazici, neutri, acizi și aromatici) cât și separarea individuală a aminoacizilor.

Se menționează, de asemenea, cromatografia în strat subțire a aminoacizilor, în care, hârtia de la cromatografia ascendentă pe hârtie este înlocuită de o placă de sticlă pe suprafața căreia este întins un strat de adsorbant cu o grosime de aproximativ 200 μ . Adsorbanții folosiți sunt oxizi, oxizi hidratați, săruri sau compuși organici: silicagel, alumină, kiselgur, silicat de magneziu, celuloză,

metilceluloză, geluri de dextran, poliamide, DEAE-sephadex etc. Aminoacizii se detectează ca și în cromatografia pe hârtie prin reacția cu ninhidrină [4].

Bibliografie selectivă

1. Lehninger A.L., *Biochimie*, vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1992
2. Nenițescu C.D., *Chimie Organică*, vol. I și II, Ed. Did. și Ped., București, 1980
3. Neurath H., Bailey K., *The Proteins Chemistry, Biological Activity and methods*, vol. I., Part A, B, Acad Press Inc. Publishers, New York, 2000
4. Tănase I., *Tehnica Cromatografică*, Editura Tehnică, București, 1997
5. Graham L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Fifth Edition, Oxford University Press, 2013
6. Sakami W., Harrington H., *Amino acid metabolism*, Annu. Rev. Biochem., 32, 1998
7. Wu G., Fang Y., Yang S., Lupton J., Tumer N., *Glutathione metabolism and its implications for health*, J. Nutr., 134 (3), 2014
8. <http://www.chempep.com/ChemPep-Amino-Acid-Overview.htm>, 2016
9. Urry D.W., *Chemical Physics Letters*, 399 (1-3), 2004
10. Brosnan J., Brosnan M., *The sulfur-containing amino acids: an overview*, J. Nutr., 136 (6 Suppl.), 2006
11. Imura K., Okada A., *Amino acid metabolism in pediatric patients*, Nutrition, 14 (1), 1998
12. Fürst P., Stehle P., *What are the essential elements needed for the determination of amino acid requirements in humans?*, J. Nutr., 134 (6 Suppl.), 2004
13. Reeds P.J., *Dispensable and indispensable amino acids for humans*, J. Nutr., 130 (7), 2000
14. Stryer L., *Biochimie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1995
15. Glaser R., *Biophysik*, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 1996
16. Eglin F., *Bausteine des Lebens*, Ralf Reglin Verlag, 2014

17. Dardevet D., *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins*, Academic Press, 2016
18. Abell A., *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics*, Vol.1, JAI Press, 1997
19. Engelking L., *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 3rd Ed., SectionI: *Amino Acid and Protein Metabolism*, Academic Press, 2014
20. <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/background.html>, 2016
21. Clerici F., Erba E., Gelmi M.L., Pellegrino S., *Non-standard amino acids and peptides: From self-assembly to nanomaterials*, Tetrahedron Letters, Volume 57 (50), 2016
22. Singh P., Brar K.S., Bajaj M., Narang N., et al., *Self-assembly of aromatic α -amino acids into amyloid inspired nano/micro scaled architects*, Materials Science and Engineering, 2016
23. Lea P.J., Azevedo R.A., *Amino Acids*, Encyclopedia of Applied Plant Sciences Second Ed., Academic Press, 2017
24. Ali T., Akhtar A., Gohain N., *Analysis of amino acids network based on distance matrix*, Physica A: Statistical Mechanics and its Applications, Vol. 452, 2016
25. Choi Suk-Hyun, Kozukue N., Kim Hyun-Jeong, Friedman M., *Analysis of protein amino acids, non-protein amino acids and metabolites, dietary protein, glucose, fructose, sucrose, phenolic, and flavonoid content and antioxidative properties of potato tubers, peels, and cortexes (pulpes)*, Journal of Food Composition and Analysis, Vol. 50, 2016
26. Cole A.L., *Amino Acids and Peptides, Essential Ingredients of Life*, Biology of Life, Biochemistry, Physiology and Philosophy, Chapter 4, 2016

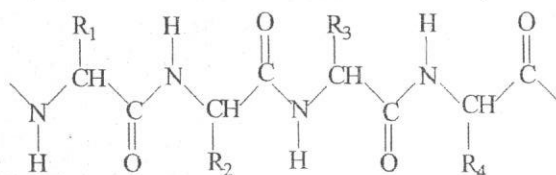
CAPITOLUL 8

8. PEPTIDE

8.1.	Caracteristici generale	674
8.2.	Sinteza peptidelor	678
8.2.1.	Sinteza peptidelor pe suport polimeric	686
8.3.	Peptide naturale	689
	<i>Bibliografie</i>	691

8.1. CARACTERISTICI GENERALE

Peptidele sunt combinațiile, cu structură amidică, rezultate din două sau mai multe molecule de aminoacizi prin eliminare de molecule de apă. Între α -aminoacizi se formează legături peptidice (amidice), care pot conduce la lanțuri macromoleculare polipeptidice:



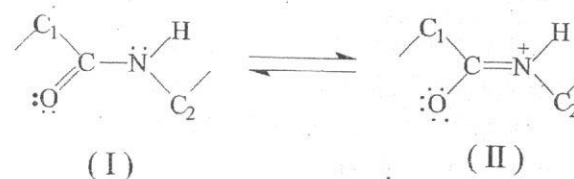
În procesul de biosinteză, ca și în diferitele reacții chimice dintre aminoacizi, se formează, în afara lanțului peptidic și alte legături covalente: esterice, tioesterice, disulfidice, ca legături secundare.

Numele de peptide vine de la *peptone*, fragmente ce se formează la hidroliza parțială a proteinelor naturale. În natură, se găsesc multe peptide de mare importanță fiziologică.

Ca și în clasa hidraților de carbon, se disting *dipeptide*, *tripeptide* etc., numite și *oligopeptide*, care conțin între 2–8 aminoacizi. În mod convențional, se consideră *polipeptide* compușii care au greutatea moleculară mai mică de 10000 și *proteine*, cei cu greutate moleculară mai mare [2].

Peptidele pot fi grupate în: *peptide cu catenă liniară, ciclică sau policiclică*. Unele peptide pot fi clasificate după activitatea lor biologică: *hormoni, antibiotice, enzime, toxine, peptide analgezice*.

Legătura peptidică reprezentată ca o structură de rezonanță în structurile limită I și II, ca urmare a conjugării $p-\pi$ din grupa amidică, are distanța C'–N cu 10% mai scurtă decât în amine, iar dubla legătură C'–O este cu 0,02 Å mai lungă decât cea cunoscută la aldehide și cetone:



În structura (I), legătura C–N conține numai electroni σ axiali permițând rotația liberă, iar în structura (II), legătura C–N conține electroni σ și π , deci este o legătură dublă, rotația este împiedicată, iar dipolmomentul este mai mare. Cu ajutorul spectrelor RMN și din lungimea legăturilor, s-a constatat că structura hibrid conține aproximativ 60% (I) și 40% (II), electronii π fiind delocalizați pe legăturile C–O și C–N. Datorită acestei conjugări, grupa C=O din amide și peptide nu dă reacții caracteristice cetonelor, iar electronii neparticipanți ai azotului nu sunt disponibili pentru legarea protonului, acestea fiind baze foarte slabe.

Deoarece structura (II) este plană, structura hibrid este, de asemenea, plană. Rotația în jurul legăturii C–N este împiedicată datorită caracterului de legătură dublă și există posibilitatea formării unor izomeri geometrici cu legătură peptidică *trans*, care este curent întâlnită și legătură peptidică *cis* prezentă foarte rar.

Având lungimile legăturilor și unghiurile relativ rigide, legătura peptidică, în ansamblu, este și ea rigidă.

Pentru a se prezenta conformația unui lanț peptidic trebuie cunoscute unghiurile diedre φ și ψ la atomii C $_{\alpha}$.

Lanțurile peptidice sunt relativ voluminoase, flexibilitatea lor este mică, legătura peptidică rigidă, iar amplasarea resturilor laterale ale diferiților aminoacizi este în esență similară. Forțele necovalente ce se stabilesc între lanțurile peptidice sunt: legăturile de hidrogen, legăturile ionice, forțele van der Waals, atracțiile hidrofobe.

Polipeptidele de tip α pot fi etirate aproximativ 100%, iar direcția orientării legăturilor de hidrogen, pusă în evidență cu ajutorul spectrelor IR polarizate, este, de obicei, axa fibrei, în cazul proteinelor fibrilare.

Spre deosebire de acest tip structural, în polipeptidele β , legăturile de hi-

drogen sunt perpendiculare pe forța de orientare și lanțul nu se poate etira. Lanțul formează structura tip „strat pliat”, unde planurilor grupelor peptidice sunt înclinate la un unghi de circa 30° față de axa fibrei.

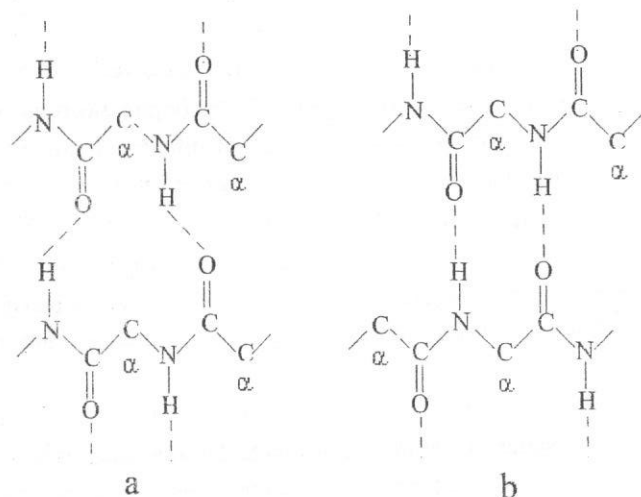


Fig.8.1. În stratul pliat lanțurile polipeptidice sunt „împachetate” paralel (a) sau antiparalel (b).

În structura stratului pliat, lanțurile polipeptidice pot fi împachetate paralel sau antiparalel (Fig.8.1.). Această deosebire în aranjarea lanțurilor poate fi pusă în evidență în spectrul IR polarizat. Studiul spectrelor IR a unor polipeptide și proteine fibrilare a permis stabilirea unor criterii de deosebire a tipurilor de împachetare, pe baza numărului și a intensității benzilor tip „Amidă I”.

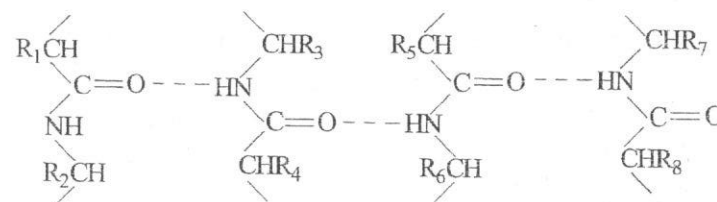
Legături de hidrogen există între resturile de aminoacizi din edificiul elicei polipeptidice, ca și între resturile laterale ale aminoacizilor sau între resturile laterale și moleculele de apă prezente în condiții fiziologice.

La denaturarea proteinelor, datorită variației pH-ului sau a temperaturii, se produce ruperea unor legături de hidrogen, mai ales, dintre restrile laterale ale aminoacizilor.

Este posibil ca transferul de energie în sistemele biologice să se realizeze

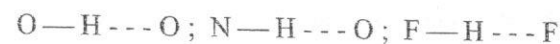
printr-un mecanism analog celui care stă la baza conductibilității în cristale.

Un lanț polipeptidic are, ca element structural fundamental, gruparea peptidică care prezintă patru electroni π . Interacția acestor electroni are loc prin legături de hidrogen care leagă transversal grupările peptidice și formează sisteme conjugate care pot da naștere la benzi de energie de tip semiconductor :



S-a constatat că pentru modelul prezentat sunt caracteristice trei benzi relativ înguste, iar separarea energetică dintre cea mai ridicată bandă ocupată și banda de conductibilitate este între 3,2 și 4,8 eV. Această valoare mare pare să indice că proteinele pure, izolate, sunt izolatori în stare fundamentală, deoarece, în cristale moleculare conductibilitatea electronică se observă atunci când, în spectrul optic, moleculele au tranziții cu energie în jur de 1 eV.

Cele mai întâlnite legături de hidrogen, în ordinea importanței sunt:



Hidrogenul este legat covalent de unul din atomii electronegativi și printr-o legătură de tip special (marcată prin puncte în formule) de celălalt atom electronegativ. Legătura de hidrogen nu este o legătură covalentă, deoarece, atomul de hidrogen nu poate folosi într-o legătură σ cu un alt element decât orbitalul $1s$, care este ocupat complet de doi electroni. Atomul de hidrogen legat covalent se deosebește, însă, de toți ceilalți atomi prin, particularitatea că norul electronic din jurul său este foarte subțire; sarcina pozitivă a nucleului de H este ecranată spre exterior de numai doi electroni. Pe de altă parte, dacă atomul (X) de care este legat covalent hidrogenul este puternic electronegativ, norul electronic este

atras spre acesta, iar nucleul H, mai puțin ecranat, poate exercita o forță de atracție asupra unui alt atom electronegativ (Y).

Atracția este cu atât mai puternică, cu cât (Y) are un volum mai mic. Atracția protonului slab ecranat se exercită asupra uneia dintre perechile de electroni neparticipanți ale atomului Y.

Legătura de hidrogen este de natură electrostatică de un tip special, depinzând de prezența unui atom de hidrogen covalent și a doi atomi foarte electro-negativi.

Sub denumirea de legături sau forțe van der Waals, se cuprind mai multe tipuri de interacțiuni între atomii nelegați chimic: forțe de atracție între molecule nepolare, numite *forțe de dispersie* și *forțe de ioni-dipoli* și *dipoli-dipoli*.

Forțele de dispersie se datoresc unor interacțiuni mecanic cuantice între atomii unor molecule diferite.

Forțele care se dezvoltă între ioni și molecule polare (dipoli permanenți), precum și între doi dipoli permanenți, sunt forțe de atracție slabe între molecule. Aceste forțe de natură electrostatică sunt mult mai slabe decât sarcinile ionilor.

Experimental, s-a dovedit că distanța între moleculele unite prin forțe van der Waals este de ordinul de 3–4 Å, deci mult mai mare decât distanțele interatomice în legăturile covalente sau ionice. Energia legăturii van der Waals este mult mai mică decât în cazul electrovalențelor.

Polimerii sintetici filabili, ca și proteinele fibrilare, de exemplu, conțin grupe polare capabile să formeze legături intermoleculare puternice, dintre care și legături de hidrogen și de tip van der Waals.

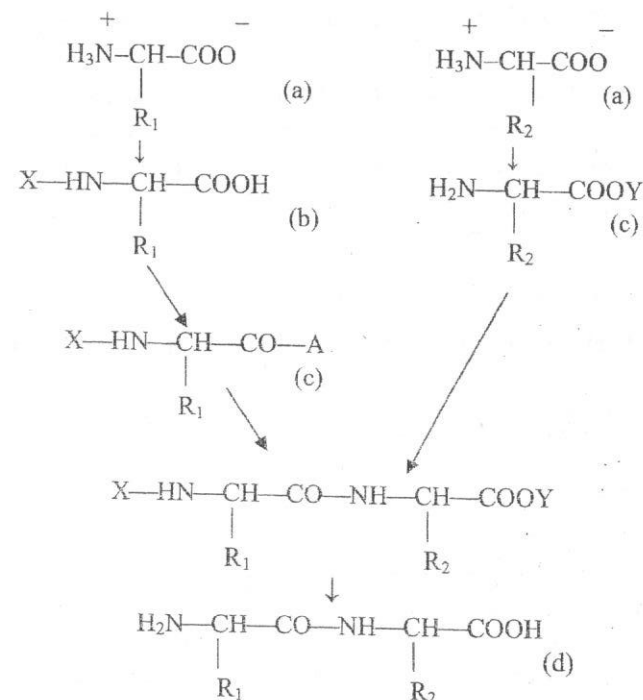
Prin orientarea și paralelizarea lanțurilor macromoleculare a polimerilor sintetici, în procesul de formare a fibrelor, se micșorează distanțele dintre lanțuri și grupele polare pot ajunge la distanța necesară formării unor legături de hidrogen care conferă fibrelor o rezistență mai mare.

8.2. SINTEZA PEPTIDELOR

Sinteza peptidelor, pornindu-se de la aminoacizi, are loc, în principal, prin sinteza fiecărei legături peptidice, pentru care se parcurg următoarele etape:

- protejarea temporară a funcțiilor ce nu participă la reacție (a);
- transformarea, de obicei, a grupei carboxil într-un derivat funcțional reactiv (b);
- formarea legăturii peptidice (c);
- deprotejarea parțială sau totală a produsului (d).

Operația se repetă pentru fiecare aminoacid sau rest de peptidă [1]:



unde: X = grupa protectoare pentru funcția aminică;
Y = grupa protectoare pentru funcția carboxilică;
A = restul activant al carboxilului.

Catenele laterale ale aminoacizilor, prin efectele lor sterice și electronice, pot influența reacțiile în etapele de protejare și de activare. Grupele reactive din

catenele laterale (OH, NH₂, COOH, SH) pot da reacții secundare și provoca o anumită labilizare a legăturii peptidice.

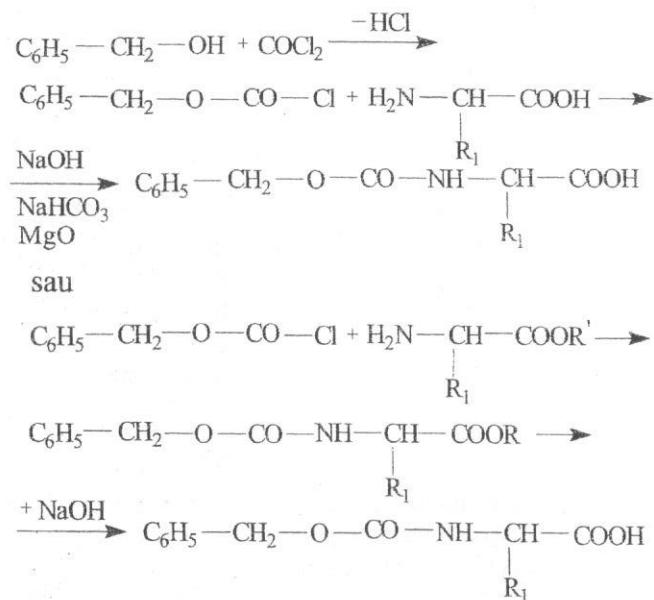
În prezent, există o diversitate de grupe protectoare, agenți de activare și metode de condensare.

Protejarea grupei amino se poate face prin *acilare*, *alchilare*, *transformare în bază Schiff* sau în *sare de amoniu*.

Pentru *acilarea* grupei aminice s-au dovedit benefice grupele protectoare de tip *uretanic-benziloxycarbonil* și unii *derivați ai acizilor carboxilici cu resturi formil, trifluoracetil și ftalil* [1].

Benziloxycarbonil-aminoacizii se obțin ușor din reacția esterului benzilic al acidului clorocarbonic cu aminoacizii sau cu esteri ai aminoacizilor.

Grupa amino protectoare N-benziloxycarbonil are aplicație practică universală și sunt numeroase procedee convenabile de îndepărtare a ei [1].



Derivații acizilor carboxilici formează cu grupa amino legături amidice care sunt dificil de îndepărtat, fără să afecteze legăturile peptidice.

Anumite resturi acil sunt, totuși, eficiente ca agenți de protejare pentru grupa amino. Astfel, *restul formil* de la derivații corespunzători de acizi carboxilici, care se atașează la funcția aminică ca grupă de protecție, poate fi ușor îndepărtată prin hidroliză în mediu acid; *restul trifluoracetil*, datorită influenței puternic electronegative a celor trei atomi de fluor, poate fi îndepărtat prin tratare cu alcalii; *grupa ftalil* se îndepărtează prin hidroliză.

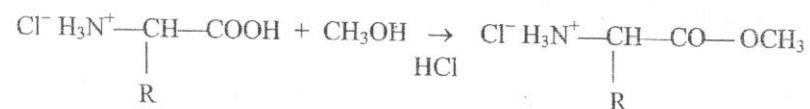
Bazele Schiff ale aminoacizilor sunt puțin stabile pentru a se putea folosi, ca grupe protectoare, la sinteza peptidelor. Protejarea prin formarea de derivați N-benziliden este folosită pentru protejarea temporară a grupei ω-amino din diaminoacizii monocarboxilici. În aceste condiții, grupa α-amino rămasă liberă se poate acila. Chiar în condiții riguroase de reacție, în mediu alcalin, nu se poate evita o transpoziție de la Nω la Nα și întotdeauna se obțin cantități mai mari sau mai mici de derivat Nω-acil-Nα-benziliden.

Esterii aminoacizilor care au tendința de a cicliza la dicetopiperazine, respectiv de a forma produși de policondensare liniară, pot fi obținuți sub formă stabilă numai ca săruri (obișnuit clorhidrați). Clorurile acide ale aminoacizilor sau peptidelor pot fi obținute numai sub formă de amoniu [1].

Protejarea temporară a grupei carboxilice asigură anularea stării de amfion și eliberează grupa aminică pentru reacția cu grupa carboxilică a altui aminoacid sau a unei peptide. După formarea legăturii peptidice, grupa carboxilică protejată trebuie eliberată, fără a afecta legătura peptidică formată.

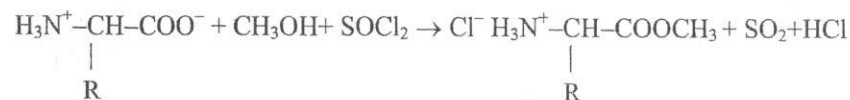
Protejarea grupei carboxil se poate face prin: *esterificare* cu *alcooli*, *transformare în amidă* și *formare de săruri*.

Esterificarea clorhidraților de aminoacizi cu alcool metilic în prezența acidului clorhidric a fost făcută de Emil Fischer:



Rezultate foarte bune se obțin la esterificarea aminoacizilor cu alcool metilic și clorură de tionil. Din reacție, nu rezultă apă și de aceea se folosește un

exces mult mai mic de alcool metilic, în cazul esterificării numai cu alcool metilic, neavând loc racemizarea aminoacizilor.



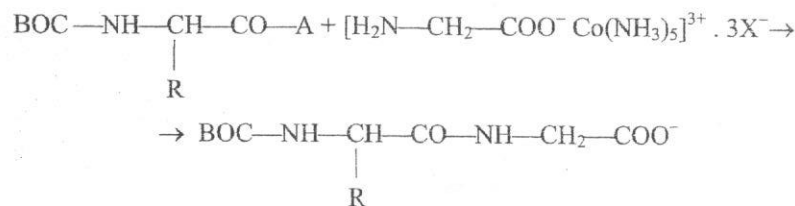
O altă posibilitate de esterificare a aminoacizilor și a peptidelor este transesterificarea în cataliză acidă, cu ajutorul unui ester ușor accesibil.

Esterii etilici se obțin prin aceleași metode, ca și cei metilici și au aproximativ aceleași proprietăți. Esterii benzilici se pot obține, cu randamente bune, sub formă de săruri cu acidul *p*-toluensulfonic, prin metoda esterificării azeotrope.

Protejarea grupei carboxil, prin transformare în amidă, se recomandă numai atunci când scindarea legăturii amidice este posibilă fără a fi atacate și legăturile peptidice, foarte asemănătoare din punct de vedere chimic.

Protejarea grupei carboxil a aminoacizilor prin formare de săruri, se bazează pe faptul că neutralizarea grupei carboxil mărește nucleofilia grupei amino. Se folosesc sărurile aminoacizilor sau peptidelor cu metale alcaline sau alcalino-pământoase, în soluții apoase sau în solvenți organici.

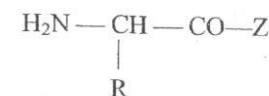
Dacă peptidele nu sunt prea hidrofiele, se poate lucra și cu săruri de amoniu sau cu săruri complexe ale metalelor tranziționale. Formarea legăturii peptidice se realizează, prin metodele generale, cu randamente de peste 90% [1].



Sinteza peptidelor are loc, cel mai frecvent, prin activarea grupei carboxil a α -aminoacizilor care înseamnă, de fapt, transformarea sa într-un derivat funcțional reactiv, după care urmează reacția cu grupa amino.

Prezența grupei $\text{C}=\text{O}$ determină punctul de atac al nucleofililor.

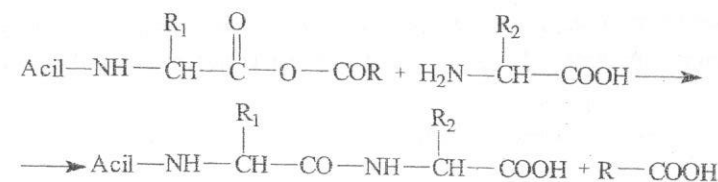
Derivații funcționali ai carboxilului din aminoacizi pot fi reprezentați prin formula generală:



în care Z poate fi o halogenură acidă, un rest de acid organic (OCOR'), un rest de alcool sau fenol (OR'), un rest de amidă ($\text{NH} - \text{R}'$).

La sinteza peptidelor activarea grupei carboxilice a aminoacizilor se poate face cu: anhidride mixte cu acizii anorganici, anhidride mixte cu acizii organici, anhidride mixte cu esteri ai acidului carbonic; esteri arilici substituiți, esteri enolici; N-acil-azoli și folosirea reactivilor activanți.

Activarea grupei carboxilice cu anhidride ale aminoacizilor cu acizii anorganici și organici au fost mult studiată și aplicată în practică. Unele au dezavantajul că alături de peptidă se formează și un acil derivat nedorit:

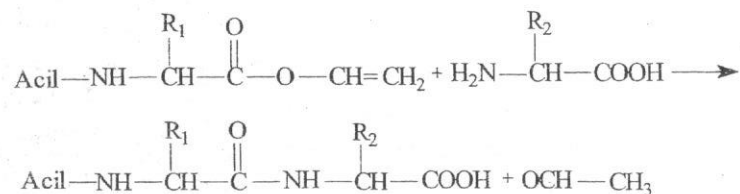
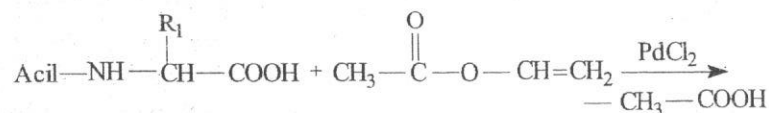


de asemenea,



Față de amine, esterii alchilici sunt mai puțin reactivi, în timp ce esterii arilici reacționează foarte ușor la formarea legăturii peptidice. Reactivitatea esterilor alchilici și arilici este amplificată dacă se introduc grupe atrăgătoare de electroni.

Esterii enolici ($\text{R} - \text{CO} - \text{O} - \text{CH} = \text{CH}_2$), în care se includ esterii vinilici și produși cu structură analoagă, rezultați din interacțiunea N-acil-aminoacizilor cu săruri de 1,2-oxazolină, formează legătura peptidică fără dificultăți, numai pentru componentele amino fără implicații sterice:



În mediul de reacție, se adaugă esteri malonici sau cianacetici, pentru a se combina cu acetaldehida rezultată din reacție, care are tendința de a se combina cu grupele aminice ale aminoacizilor.

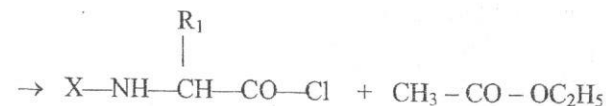
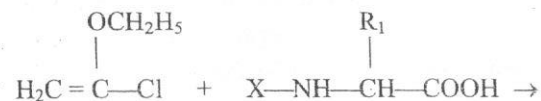
Pentru a se suprima etapa de activare a funcțiilor implicate în formarea unei noi legături peptidice, s-au experimentat o serie de reactivi activanți, cu ajutorul cărora etapa de activare și cea de formare a legăturii peptidice au loc concomitent. Astfel de reactivi sunt unii esteri nesaturați, carbodiimide, cianamide, cetenimine, cetene.

Din rândul esterilor nesaturați, se menționează α -clor-vinil-etil-eterul și α , α -diclordietil-eterul :

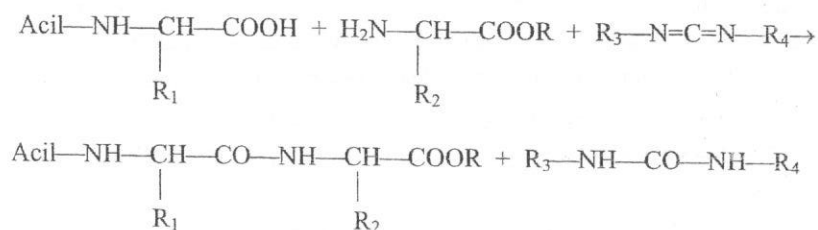


care asigură randamente bune la formarea legăturii peptidice.

În cazul α -clor-vinil-etil-eter, reacția de condensare este precedată de adăugarea componentei carboxil la dubla legătură a reactivului, cu formarea unei cloruri acide reactive, care acilează componenta amino [1]:

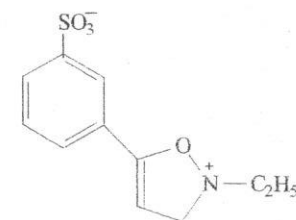


Reacția în prezența carbodiimidelor se produce astfel:



Cea mai folosită carbodiimidă este dicitlohexilcarbodiimida.

Reactivul Woodward K (3'-sulfonatul de 2-etil 5-fenil-1,2-izoxazoliu) este cea mai folosită sare de oxazoliu la sinteza peptidelor. Cu acest reactiv se pot prepara dipeptide ale glutaminei, asparaginei și hidroxiaminoacizilor fără a mai fi necesară protejarea funcțiilor neimplicate în formarea legăturii peptidice. La sinteza peptidelor, se produce o racemizare redusă.



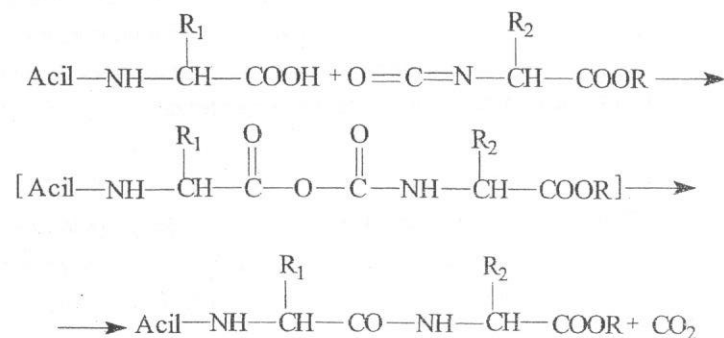
Sarea Woodward R

Grupa aminică a unui aminoacid, spre deosebire de grupa carboxilică, poate forma o legătură peptidică prin intermediul perechii de electroni neparticipanți de la atomul de azot.

În practică, pentru sinteza peptidelor, activarea grupei aminice se face cu intermediari reactivi asemănători celor de la grupa carboxilică. Se menționează

formarea legăturii peptidice cu ajutorul izocianatilor, anhidridelor aminelor acidului fosforos și cu esterii acidului fosforic.

La sinteza legăturii peptidice cu ajutorul izocianatilor se formează o anhidridă mixtă, care prin decarboxilare conduce la peptidă:



8.2.1. SINTEZA PEPTIDELOR PE SUPORT POLIMERIC

La sinteza peptidelor prin metoda „pas cu pas” sau la „condensarea fragmentelor peptidice”, este necesară o activitate foarte laborioasă pentru separarea și purificarea peptidelor rezultate.

Formarea catenei peptidice pe un suport polimeric simplifică mult aceste operații intermediare [1].

Prima legătură, de obicei esterică, se formează între grupa reactivă a suportului polimer insolubil cu grupa carboxil a aminoacidului N-protejat, după care se face condensarea, „pas cu pas”, a aminoacizilor pentru formarea lanțului peptidic.

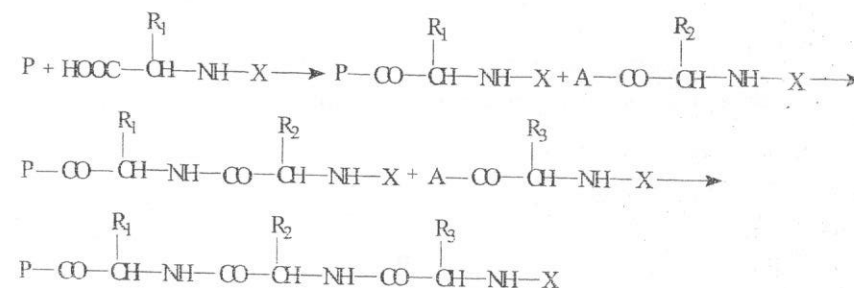
La sfârșitul sintezei, legătura polimer-peptidă este scindată, peptida solubilă este separată de polimerul insolubil și supusă purificării.

Operațiile de purificare se limitează la spălări ale reactivilor în exces și a produșilor secundari solubili. Lanțul peptidei trebuie să fie bine legat de polimerul insolubil, iar reacțiile de creștere a peptidei, „pas cu pas”, trebuie să se producă mereu cu un randament cât mai apropiat de 100 %.

Suportul este, de obicei, un polimer sintetic care are grupe reactive.

Grupa amino protejată nu poate reacționa cu polimerul. Polimerul trebuie să fie insolubil în toți solvenții folosiți, să prezinte o formă fizică stabilă și să conțină o grupă reactivă la care să se poată lega ușor aminoacidul, printr-o legătură covalentă.

Merrifield R.B., care a prezentat pentru prima dată modul de sinteză a peptidelor pe suport polimer, a selectat polistirenul reticulat cu 1-2% divinilbenzen, sub formă de particule de 20-80μ, complet insolubil în solvenții obișnuiți și care se umflă în diclormetan, dimetilformamidă, dioxan, cloroform.



Ca grupe reactive ale polimerului suport s-au dovedit a fi indicate grupele: clormetil (—CH₂Cl), hidroximetil (—CH₂—OH), sulfonamina (—SO₂—NH₂), brommetil (—CH₂Br) etc.

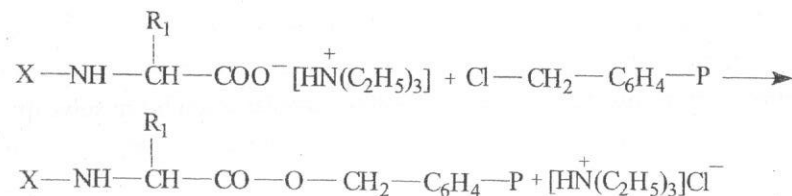
În afara suporturilor pe bază de polistiren, s-au utilizat și diferiți polifenoli, rezitoli metilați la OH-ul fenolic și clormetilați în nucleu.

S-a propus ca suport un polimer solubil, polietilenglicolul (HO—PRG—OH), cu care *sinteza de peptide are loc în soluție*, spre deosebire de prepararea peptidelor pe suport solid, care se execută în fază heterogenă.

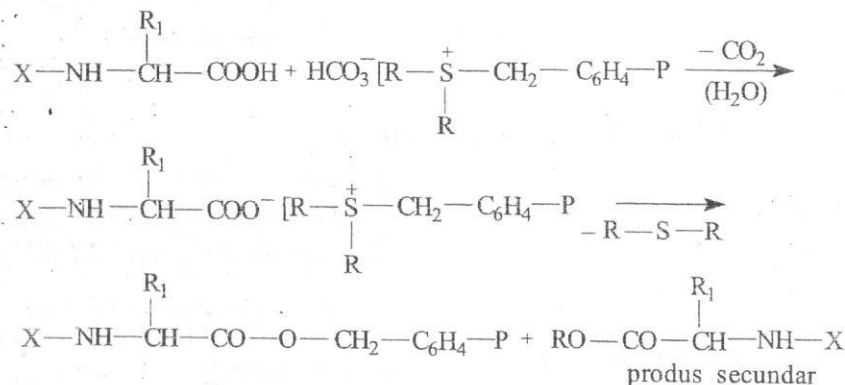
În timp ce la sinteza în fază heterogenă, controlul secvenței se poate face numai după scindarea produsului de pe suportul solid, în cazul polimerului solubil, există posibilitatea controlului analitic fără scindarea de pe polimer.

Atunci când se constată o greșeală de secvență, se poate face purificarea intermediară a peptidei. Peptida ajunsă la dimensiunea dorită se scindează prin aminoliză, transesterificare sau hidroliză.

Metoda cea mai folosită pentru legarea aminoacizilor N-substituiți pe suportul polimeric clorometilat, constă în încălzirea sării de trietilamoniu a primului aminoacid N-protejat, cu suportul suspendat în alcool etilic, sau în alți solvenți, la reflux:



În condiții foarte blânde, se obține aminoacil-polimerul cu randament de 90%, dacă se folosesc suporturi bazice de dialchil-(arilmetil)-sulfoniu [1]:



Polimerul suport pe care s-au fixat primii aminoacizi C-terminali este gonflat și spălat cu un solvent adecvat, după care se scindează grupa N-protectoare pentru a elibera funcția amino. Reactivii de deprotezare și substanța scindată sunt spălați. Dacă grupa N-protectoare a fost scindată cu un acid, grupa amino eliberată este blocată prin protonare, pentru care motiv se tratează cu o bază terțiară, după care polimerul suport, cu primul aminoacid fixat, se spală pentru îndepărtarea excesului de reactiv. Urmează formarea legăturii peptidice și construirea, pas cu pas, a lanțului peptidic, prin tratarea succesivă cu

aminoacizi acilați la grupa carboxilică și cu grupa aminică protejată etc. și în final are loc scindarea peptidei formate de pe polimerul suport [1].

La sinteza peptidelor, poate avea loc un proces de racemizare care este nedorit. Se știe că toți aminoacizii, în afară de glicină, sunt optic activi. La sinteza unei peptide, poate avea loc introducerea în catenă a unui anumit enantiomer, care poate provoca racemizarea și producerea unui amestec de peptide. De obicei, se racemizează restul de aminoacid ce se acilează.

Sub influența bazelor se formează un carbanion la atomul de carbon asimetric din poziția α . Mobilitatea protonului din poziția α este determinată de substituenții legați de atomul de carbon asimetric, de grupele α -amino și α -carboxil-protectoare, precum și de natura catenei laterale. Separarea amestecului de diastereo-izomerie produsă în urma racemizării este foarte dificilă.

8.3. PEPTIDE NATURALE BIOLOGIC ACTIVE

O serie de peptide naturale au acțiuni biologice ca: *antibiotice, enzime, hormoni, toxine*. În acest domeniu, cercetările s-au axat pe stabilirea structurii unor peptide biologice active, corelația dintre structură, activitatea biologică și sinteza unor peptide cu activitate biologică.

Se cunosc peste 200 de *antibiotice* cu structură peptidică și depsipeptidică. Unui număr însemnat de astfel de peptide li s-au determinat structura și, din acestea, o parte au fost sintetizate.

Unele antibiotice peptidice conțin aminoacizi care nu se găsesc în proteinele plantelor și animalelor și a căror prezență probabil că determină activitatea lor biologică. Unele antibiotice peptidice conțin, în structura lor, lipide care contribuie la solubilitatea antibioticului în grăsimi.

Antibioticele peptidice conțin peptide cu doi aminoacizi (*penicilina*), până la 15 aminoacizi (*gramicidina A*) sau mai mulți și au masa moleculară până la 14000.

Dintre antibioticele peptidice și depsidice care au fost sintetizate și experimentate se menționează: *grupa actinomycinei, grupa tirotricinei, tirocidinei și gramicidinei, grupa polymyxinei, grupa stafilomycinei S, ostreogrycinei B, vernamycinei B, etamycinei, mikamycinei*.

Hormonii peptidici și proteici sunt formați din lanțuri liniare de α -aminoacizi dintre care și cisteina, care formează, în unele cazuri, legături transversale între lanțuri sau inele ciclice.

Numărul aminoacizilor din catenă variază de la 6 (*eledoizina*) la 188 (*hormonul uman de creștere*).

Din rândul acestor hormoni se menționează:

- hormonii glandei hipofize (hipofiza posterioară – *oxitocina, vasopresina*; hipofiza anterioară – *adreno-corticotropina, tireotropina, somatotropina, prolactina, hormonul luteinizant, hormonul foliculostimulant*; hipofiza parțial intermediară și parțial anterioară – *melanotropina*;
- hormonii pancreatici – *insulina, glucagonul*;
- hormonii tisulari – *angiotensinele, bradikina, kalidina, eledoisina, substanța P*;
- hormonii tractului gastrointestinal – *gastrina, secretina*.

S-au identificat o serie de peptide cu acțiune toxică (*toxine*) ca *apamina* din veninul de albine, *phalloidina* și *amantina* din ciupercile otrăvitoare etc.

S-au făcut mari progrese în studiul, producerea și aplicarea unor peptide cu acțiune hormonală, de importanță imunologică deosebită, bioregulatori, neuro-peptide implicate în activitatea sistemului nervos central, noi antibiotice etc. Se obțin peptide pe cale de sinteză sau prin extracție din surse naturale.

Bibliografie selectivă

1. Cuiban F. Lupea A-X, *Studiul structurii și sinteza peptidelor*, Editura Academiei Române, București, 1989
2. Nenițescu C.D., *Chimie organică*, vol.I și II, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1980
3. Chiriță G., Chiriță M., *Chimia pielii*, ed.II, Ed. I.P.Iași, 1987

4. Dickerson E.R., Geis I., *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim / Bergstrasse, 1971
5. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu – Gheorghiu M., *Biochimie medicală*, Editura Medicală, București, 1980
6. Lehninger A.L., *Biochimie*, vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1992
7. Needleman S., *Protein Sequence Determination*, Ed.II, Springer, Heidelberg, 1975
8. Fasold H., *Die Struktur der Proteine*, Verlag Chemie, 1972
9. Dayhoff M.O., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Natl. Biom. Res. Foundation, vol. I – V, Washington, 1966
10. Erickson B., Merrifield R., *The Proteins*, vol.II, Ed.III, Ed. H. Neurath, R. Hill, New York, Academic Press, 1976
11. Birr C., *Aspects of the Merrifield Peptide Synthesis*, Ed. K. Hafner, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978
12. Schmidt G., *Recent Developments in the Field of Biologically Active Peptides*, în *Topics in Current Chemistry*, vol.136, Springer, Berlin 1986
13. Bădilescu I.I., Bădilescu S., *Legătura de hidrogen*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București, 1981
14. Clerici F., Erba E., Gelmi M.L., Pellegrino S., *Non-standard amino acids and peptides: From self-assembly to nanomaterials*, Tetrahedron Letters, Volume 57 (50), 2016
15. Baldwin M.A., *Peptides and Proteins Studied Using Mass Spectrometry*, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition), 2017
16. Fang Z., Cheng H., Liang L., *Natural biodegradable medical polymers: Therapeutic peptides and proteins*, Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers, Materials and Properties, 2017
17. Rautenbach M., Troskie M.A., Vosloo J.A., *Antifungal peptides: To be or not to be membrane active*, Biochimie, Vol.130, 2016
18. Visser R., Rico-Llanos G.A., Pulkkinen H., Becerra J., *Peptides for bone tissue engineering*, Journal of Controlled Release, 2016
19. Takahashi T., Gallo R.L., *The Critical and Multifunctional Roles of Antimicrobial Peptides in Dermatology*, Dermatologic Clinics, Vol.35, (1), 2017
20. Mikulášková B., Maletínská L., Zicha J., Kunes J., *The role of food intake regulating peptides in cardiovascular regulation*, Molecular and Cellular Endocrinology, Vol.436, 2016

21. Caron J., Domenger D., Belguesmia Y., Kouach M., et all., *Protein digestion and energy homeostasis: How generated peptides may impact intestinal hormones?*, Food Research International, Vol. 88, Part B, 2016
22. Masaaki Yoshikawa, *Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects*, Peptides, Vol. 72, 2015
23. Davis P.T., Abbruscato T.J., Eggleton R.D., *Peptides at the blood brain barrier: Knowing me knowing you*, Peptides, Vol. 72, 2015
24. Ramirez-Carreto S., Jimenez-Vargas J.M., Rivas-Santiago B., et all., *Peptides from the scorpion Vaejovis punctatus with broad antimicrobial activity*, Peptides, Vol. 73, 2015
25. Liu M., Wang Y., Liu Y., Ruan R., *Bioactive peptides derived from traditional Chinese medicine and traditional Chinese food: A review*, Food Research International, Vol.89, Part 1, 2016
26. Martinez-Villaluenga C., Penas E., Frias J., *Bioactive Peptides in Fermented Foods: Production and Evidence for Health Effects*, Chapter 2, Fermented Foods in Health and Disease Prevention, Academic Press, 2017
27. Crews C., Clarke D., *Natural Toxicants: Naturally Occurring Toxins of Plant Origin*, Encyclopedia of Food Safety, Vol.2., 2014
28. Mari F., Tytgat J., *Natural Peptide Toxins*, Comprehensive Natural Products II, Vol.II, Natural Products Structural Diversity, 2010
29. Bolhassani A., Jafarzade B.S., Mardani G., *In vitro and in vivo delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides*, Peptides, 87, 2017

CAPITOLUL 9

9. BIOSINTEZA PROTEINELOR

9.1.	Traducerea mesajului genetic la biosinteza proteinelor	694
9.2.	Inhibitori ai sintezei proteice	699
9.3.	Poliribozomii	701
9.4.	Mitocondriile	703
9.5.	Codificarea informației genetice	704
9.5.1.	Originea și evoluția codului genetic	708
9.6.	Purificarea proteinelor	712

Bibliografie

716

9.1. TRADUCEREA MESAJULUI GENETIC LA BIOSINTEZA PROTEINELOR

Dintre procesele celulare cu consum de energie liberă care se realizează ca lucru chimic (*biosinteza*), lucru mecanic (*contractia și motilitatea*) sau ca urmare a procesului osmotic sau al concentrației (*transportul activ*), cea mai complexă este *biosinteza* majorității compușilor moleculari celulari, pornindu-se de la precursori simpli.

În celule, are loc biosinteza biomoleculelor neinformaționale (hidrați de carbon, lipide, aminoacizi și nucleotide) și a biomoleculelor informaționale (acizi nucleici și proteine).

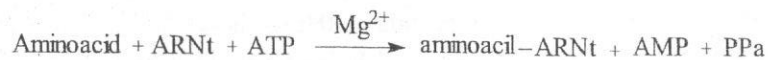
La biosinteza proteinelor, formarea legăturilor peptidice între aminoacizi are loc pe ribozomi, formarea lanțului polipeptidic producându-se în direcția amino → carboxil.

Informația genetică conținută în secvența de nucleotide a ARNm este tradusă în structura proteică prin mecanisme, în care, pe ribozomi, este construit lanțul polipeptidic din secvența corespunzătoare de aminoacizi conform informației genetice transferate de ARNm.

Sinteza lanțului polipeptidic are loc în patru etape principale: *activarea*, *inițierea*, *alungirea (elongația)* și *terminarea*. În fiecare etapă, acționează enzime specifice și cofactori.

În prima etapă, *activarea*, care are loc în citoplasma solubilă, aminoacizii sunt esterificați cu acizii ribonucleici de transfer (ARNt corespunzători prin acțiunea unor enzime, numite enzime de activare a aminoacizilor, aminoacil-ARNt sintetaze), fiecare din aceste enzime având o înaltă specificitate pentru un anumit aminoacid și pentru ARNt al său.

Reacția enzimatică de activare este:



La reacția de activare, are loc hidroliza ATP și formarea AMP și pirofosfat. Transferul unui aminoacid pe ARNt-ul specific are loc în trei etape:

1. În prima etapă, *activarea*, ATP reacționează cu aminoacidul, are loc punerea în libertate a pirofosfatului și formarea unui intermediar legat de enzimă, *aminoacil-acid adenilic* (Fig.9.1.) [2]. La acest intermediar, gruparea carboxil a aminoacidului este legată, printr-o legătură de tip anhidridă, de gruparea 5'-fosfat din AMP.

Aminoacil-ARNt sintetazele au o mare specificitate atât pentru aminoacid, cât și pentru ARNt corespunzător. Pentru fiecare aminoacid există mai mult decât un singur ARNt.

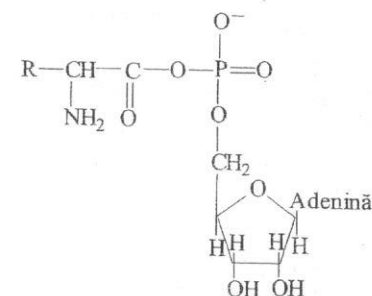
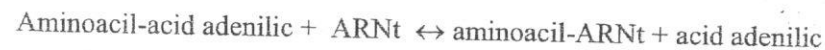


Fig.9.1. Structura generală a aminoacil-adenilaților [2]

2. În a doua etapă, gruparea aminoacil este transferată de pe AMP la capătul 3' al ARNt urmată de eliberarea aminoacil-ARNt și acid adenilic:



În etapa a doua, numită de *inițiere*, ARNm purtător al informației genetice, care specifică secvența de aminoacizi și pe primul său aminoacil-ARNt de inițiere sunt legați de subunitatea mică (30S) a ribozomului, un proces care necesită prezența a trei proteine specifice numite factori de inițiere (FI-1, FI-2, FI-3) cât și GTP (guanozin 5'-trifosfat) și Mg^{2+} .

Subunitatea mare (50S) a ribozomului se leagă apoi de acest complex pentru a forma ribozomul funcțional (70S).

Lanțurile polipeptidice sunt construite începând cu restul de aminoacid N-terminal. Noi resturi de aminoacil sunt adăugate la gruparea carboxil C-termin.

nală a peptidil-ARNt, printr-o deplasare nucleofilă a ARNt din legătura sa esterică cu atomul de carbon carboxilic al aminoacilului.

La *Escherichia coli*, aminoacidul de inițiere este N-formilmietionina care intră ca N-formilmietionil-ARNt.

N-formilmietionil-ARNt și ARNm se leagă de subunitatea 30 S a ribozomului pentru a forma complexul de inițiere, proces care necesită prezența GTP și a celor trei factori de inițiere FI-1, FI-2, FI-3.

Subunitatea 30 S se leagă de ARNm pe un loc specific, situat la circa 10 nucleotide de capătul 5' al ARNm. Formilmietionil-ARNt se leagă de complex recunoscând codonul AUG sau GUG de la ARNm.

Complexul de inițiere se combină apoi cu subunitatea 50 S pentru a forma ribozomul funcțional 70 S, în care formilmietionil-ARNt ocupă locul peptidil (P) din ribozom (Fig.9.2).

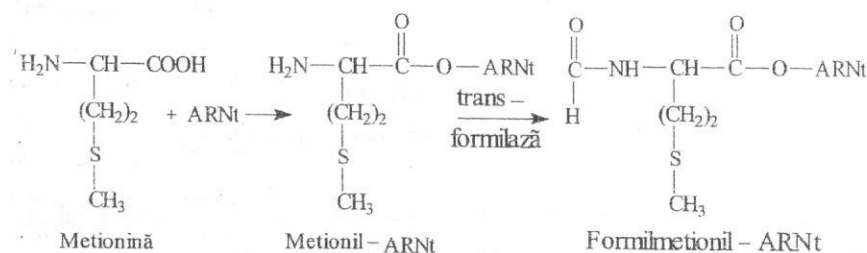


Fig.9.2. Formarea formilmietionil-ARNt

În ribozomi, mai există un al doilea loc adiacent numit aminoacil (A), care în complexul de inițiere, este gol (fig.10.3.) [4].

3. În etapa a treia, *alungirea* sau *elongația*, lanțul polipeptidic este mărit prin adăugarea segvențială a noi resturi de aminoacil transferați enzimatic de pe esterii aminoacil-ARNt, fiecare dintre ei fiind legați de ribozom ca răspuns la un codon specific sau triplet de baze pirimidinice sau purinice din molecula de ARNm.

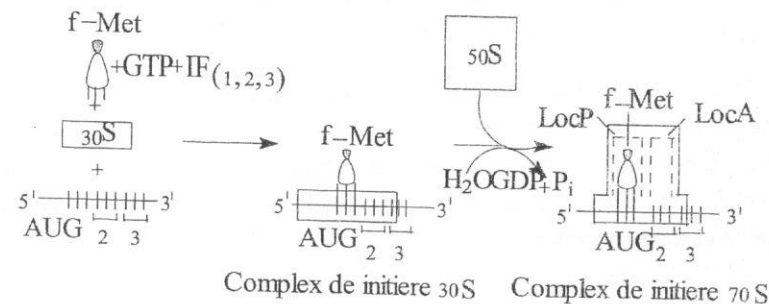


Fig.9.3. Faza de inițiere al sintezei lanțului polipeptidic la procariote [4]

Formarea unei legături peptidice are loc prin transferul formamil-mietioninei de pe locul P, pe gruparea amino din aminoacil-ARNt de pe locul A, reacție catalizată de o peptidiltransferază (Fig.9.4) [4].

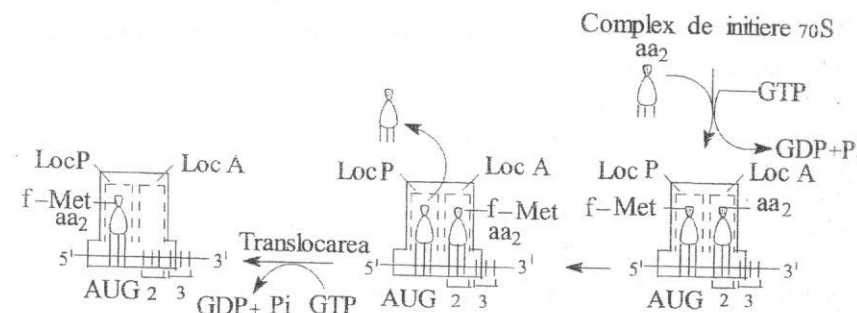


Fig.9.4. Faza de elongație la sinteza lanțului polipeptidic la procariote.

În urma formării legăturii peptidice pe locul A, pe locul P, rămâne un ARNt liber și pe locul A, un dipeptidil-ARNt. Urmează perioada de translocare în care, ARNt liber părăsește locul P, iar dipeptidil-ARNt se mută de pe locul A pe locul P, concomitent cu deplasarea ARNm cu trei nucleotide spre capătul 3'.

În acest fel, codonul următor de pe ARNm este pregătit a fi citit de către anticodonul unui aminoacil-ARNt corespunzător.

În procesul de elongație, intervin doi factori de elongație de natură proteică, FE-T, FE-G și hidroliza GTP.

După translocare, ciclul elongării se repetă, deoarece pe locul A se înseamnă un alt aminoacil-ARNt, cel care urmează în secvența lanțului polipeptidic și este specificat de codonul din ARNm aflat în locul A. Astfel mesajul genetic reprezentat de codonii din ARNm, este citit de anticodonii din ARNt și tradus în formarea legăturilor peptidice între aminoacizii din secvența specificată de gena copiată de pe ADN de către ARNm [4].

În etapa a patra a sintezei proteice, numită de *terminare*, în momentul când lanțul polipeptidic este completat, care corespunde cu momentul atingerii codonului de terminare din ARNm, polipeptidil-ARNt este eliberat din legătura sa cu ARNt și cu ribozomul, prin acțiunea factorilor de desprindere R₁ și R₂, care sunt niște proteine specifice.

Lanțul polipeptidic, în timpul sintezei sale, atât în celulele procariote cât și eucariote, se formează începând cu aminoacidul amino-terminal, a cărui grupare carboxil formează o legătură peptidică cu gruparea amino a aminoacidului următor din lanț.

Adăugarea de noi resturi de aminoacizi la capătul liber carboxil-terminal al lanțului polipeptidic în creștere, continuă până când lanțul este complet [2].

La eucariote, majoritatea proteinelor sunt sintetizate în ribozomii 80 S din citosol, care sunt formați din subunitățile 40 S și 60 S. La eucariote, inițierea sintezei lanțului peptidic are loc prin metionil-ARNt, care nu este formilat ca la bacterii.

Viteza de formare a unui lanț polipeptidic complet prin sinteză în celulele procariote și eucariote este apreciabilă. Astfel, în *E. coli* și în alte bacterii, crescând în condiții optime, un ribozom poate insera într-un lanț polipeptidic aproximativ 20 de aminoacizi pe secundă.

La temperatura de 37°C, un singur ribozom, dintr-un reticulocit intact de iepure, poate sintetiza un întreg lanț α de hemoglobină (146 de resturi) în aproximativ 3 min, adică, în circa o secundă pentru un rest de aminoacid încorporat [2].

Gruparea N-formil a restului de metionină nu apare în proteina finită a

procariotelor, deoarece este îndepărtată de o deformilază. Restul metionil de inițiere a unor polipeptide poate fi îndepărtat de către o metionin-aminopeptidază.

Legăturile disulfidice transversale dintre lanțuri se formează pe cale enzimatică, după ce lanțurile polipeptidice au fost deja construite. Informația necesară stabilirii corecte a legăturilor transversale în proteine se află în însăși secvența aminoacizilor din lanțul polipeptidic. Alte modificări covalente includ reacțiile de fosforilare, metilare, hidroxilare, cât și reacții de fixare a grupărilor proteice.

9.2. INHIBITORI AI SINTEZEI PROTEICE

Cei mai mulți inhibitori ai sintezei proteice se combină cu una din cele două subunități ribozomale și interferează cu o anumită etapă a sintezei.

Din clasa antibioticelor se menționează: *tetraciclina* (inhibă legarea aminoacil-ARNt la unitățile mici ribozomale), *puromicina* (este similară aminoacil-ARNt, și împiedică transferul peptidelor rezultate în terminalele premature la procariote și eucariote), *cloramfenicolul* (inhibă peptidil-transferazele la procariote), *ciclohexamida* (inhibă peptidil-transferazele la eucariote), *streptomicina* (inhibă inițierea lanțului peptidic procariotic, de asemenea, induce citirea greșită de ARNm), *neomicina* (similară în activitate cu streptomicina), *canamicina*, *eritromicina* (inhibă translocația procariotică între unitățile mari de ribozomii), iar din rândul altor substanțe toxice: *emetina*, *toxina difterică*, *abrina*, *acidul fusidic* și *ricina* (Fig.9.5.) [2].

Cloramfenicolul inhibă sinteza proteică pe ribozomul 70 S al celulelor procariote și al mitocondriilor celulelor eucariote, prin blocarea transferului de peptidil-ARNt, dar nu inhibă sinteza proteică pe ribozomul 80 S al celulelor eucariote. Cloramfenicolul este relativ toxic, deoarece inhibă sinteza proteică în ribozomii mitocondriali.

Ciclohexamida inhibă sinteza proteică pe ribozomul 80 S al eucariotelor, dar nu inhibă în ribozomul 70 S al procariotelor. Ciclohexamida blochează formarea legăturilor peptidice.

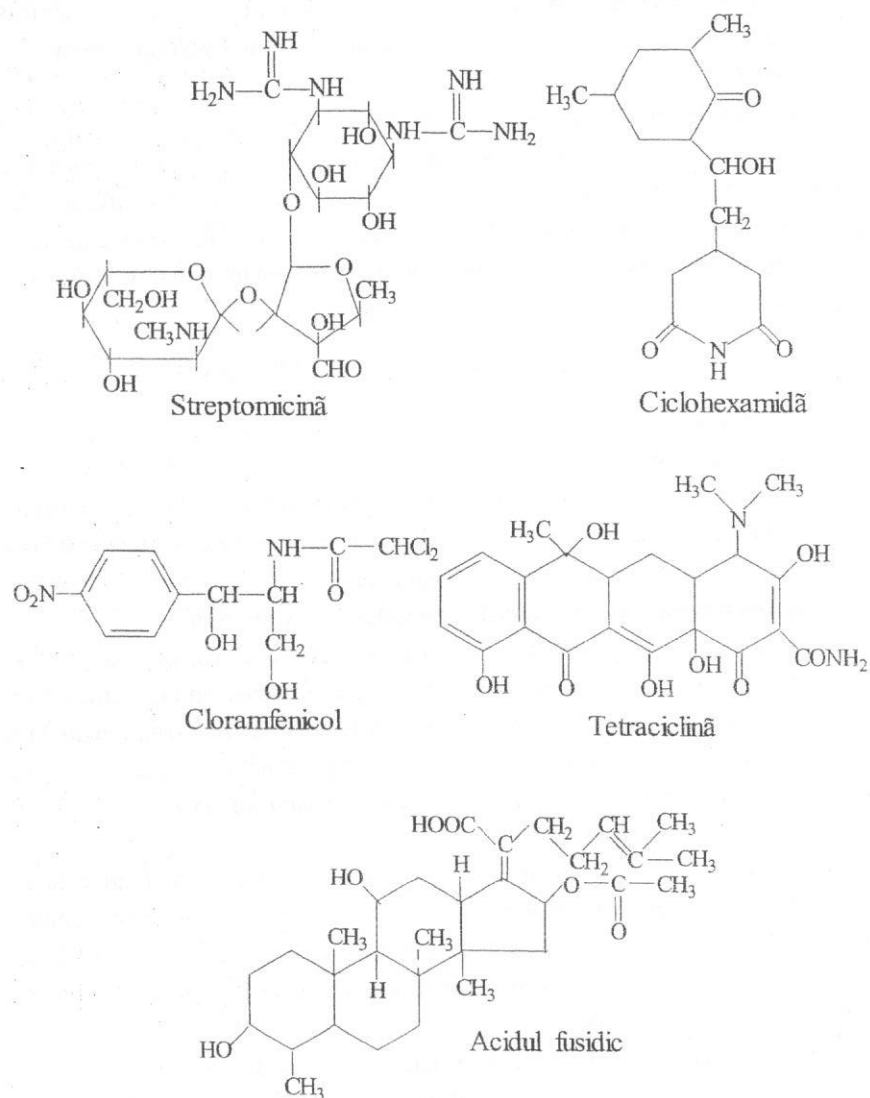


Fig.9.5. Inhibitori ai sintezei proteice

Puromicina inhibă sinteza lanțului polipeptidic interacționând pe ribozom cu peptidil-ARNt, formând peptid-puromicină, care se desprinde de pe ribozom.

Streptomicina, neomicina și canamicina se leagă de subunitatea mică a ribozomilor celulelor procariote. Ele inhibă sinteza proteică și produc citirea greșită a codonului genetic.

Alcaloidul emetina inhibă legarea aminoacil-ARNt. Toxina difterică, secretată de bacteria difterică, este o enzimă care catalizează reacția dintre NAD^+ [nicotinamid-adenin dinucleotid (difosfopiridin nucleotid)] și factorul de elongație FE-2 în ribozomii celulelor eucariote, pentru a rezulta un complex inactiv ADP-riboză – FE – 2, ceea ce duce la blocarea translocăției [2].

Abrina și ricina sunt două proteine vegetale toxice, care inhibă sinteza proteică pe ribozomii eucariotelor, prin inactivarea subunităților 60 S, blocând astfel elongația.

9.3. POLIRIBOZOMII

Poliribozomii sau polizomii sunt grupări de 3–4 până la 100 de ribozomi, care pot fi fragmentați până la *monozomi* de către ribonuclează.

Aceasta arată că poliribozomii pot fi ținuți împreună de către ARNm.

În figura 9.6. se observă ribozomii așezați unii lângă alții la anumite distanțe și fibrele de ARNm.

Fiecare ribozom a unui poliribozom poate realiza un lanț polipeptidic complet. Un astfel de aranjament folosește mult mai bine matrița de ARNm, deoarece mai multe lanțuri polipeptidice pot fi sintetizate simultan (Fig.9.7.) [2].

Sinteza proteică, la cele mai multe organisme, consumă mai multă energie decât oricare alt proces de biosinteză. În celulele de *E. coli* pentru sinteza proteică se consumă până la 90 % din energia celulară. S-a constatat că patru grupări fosfat macroergice sunt necesare pentru sinteza fiecărei legături peptidice din lanțul polipeptidic complet. Acest lucru reprezintă o forță termodinamică, cu mult în exces în direcția sintezei, deoarece sunt investite un total de $-7,3 \times 4 = -29,2 \text{ Kcal}$ ($7,3 \text{ Kcal/mol}^{-1} = \Delta G^0$ = variația energiei libere standard de hi-

droliză, la pH=7, pentru $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}$) pentru a genera o legătură peptidică a cărei energie liberă standard de hidroliză (ΔG^0) este de cel mult $-5,0$ Kcal.

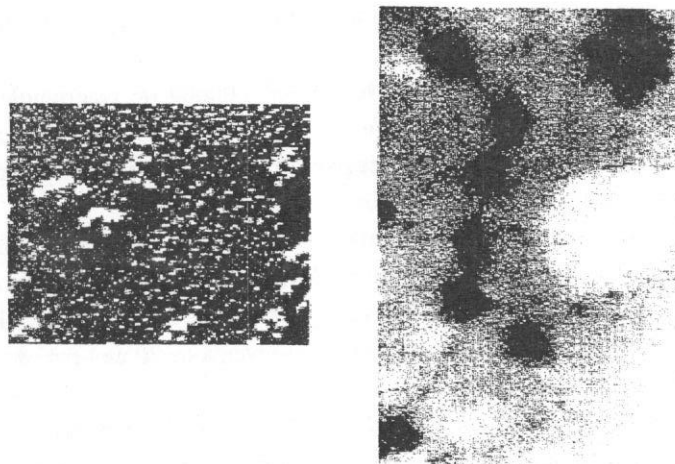


Fig.9.6. Imagine electronmicroscopică a poliribozomilor din reticulocite care sintetizează lanțurile polipeptidice ale hemoglobinei (A. Rich) [2].

Deci, ΔG^0 a sintezei legăturii peptidice este în jur de $-24,2$ Kcal, energie de pe seama legăturii fosfat macroergice. Este un proces ireversibil, iar consumul de energie pe care celula trebuie să-l facă asigură fidelitatea în traducerea mesajului genetic al ARNm în secvența de aminoacizi a proteinelor.

Biosinteza lanțurilor polipeptidice pe ribozomii citoplasmatici 80 S din celulele eucariote urmează același model ca cel al ribozomilor 70 S din bacterii, însă cu unele diferențe de detalii [2].

În celulele eucariote, ribozomii se găsesc liberi în citoplasmă sau sunt legați de reticulul endoplasmatic, iar în celulele procariote se găsesc liberi în citoplasmă și, mai ales, sub formă de poliribozomi.

Se pare că ribozomii liberi din citoplasma eucariotelor participă, mai ales, la biosinteza proteinelor destinate utilizării intracelulare, pe când ribozomii ata-

șați la reticulul endoplasmatic participă, în principal, la sinteza proteinelor ce vor fi transportate în afara celulei.

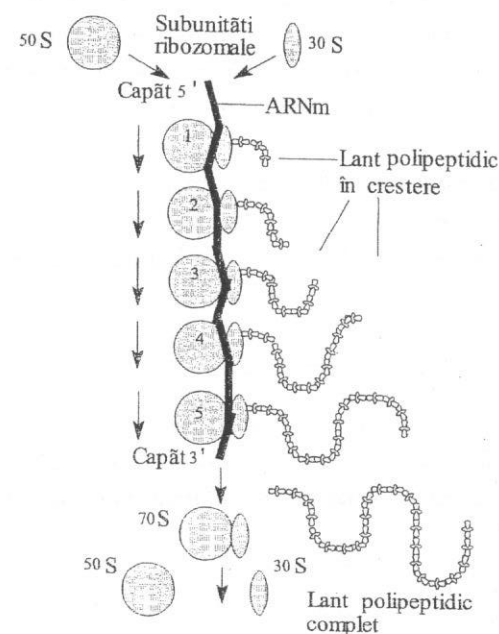


Fig.9.7. Un polizom. Cinci ribozomi citesc simultan ARNm deplasându-se de la capătul 5' la capătul 3'.

9.4. MITOCONDRIILE

Mitocondriile conțin toate componentele esențiale necesare sintezei proteice: ARNm, ARNt, ribozomi și aminoacil-ARNt sintetaze, toate însă deosebindu-se de aceleași elemente pentru sinteza proteică extramitocondrială la eucariote [2].

Sinteza proteică de pe ribozomii mitocondriali este inhibată de cloramfenicol, pe când sinteza proteică extramitocondrială de pe ribozomii 80 S din celulele eucariote nu este inhibată de acest antibiotic. Sinteza proteică mitocon-

drială utilizează N-formilmetionina ca aminoacid de inițiere, pe când ribozomii citoplasmatici 80 S folosesc metionina. În mitocondrii, se găsește 0,1–0,2% ADN din totalul ADN celular, care diferă de ADN nuclear, prin bazele pirimidinice și purinice conținute, iar masa sa moleculară este de circa 10 milioane.

Mitocondriile conțin și o ARN-polimerază dependentă de ADN care este inhibată de actinomicina D. Mitocondriile sunt capabile de a genera ARNm din ADN-ul lor.

Majoritatea enzimelor mitocondriale și proteinele celulare sunt codificate de gene din cromozomii nucleari și sunt sintetizate pe cromozomii extramitocondriali. ADN mitocondrial codifică ARN-urile ribozomale mitocondriale și probabil cea mai mare parte a ARNt mitocondriale.

9.5. CODIFICAREA INFORMAȚIEI GENETICE

Determinarea structurii moleculare a acizilor nucleici și a rolului lor genetic a condus la ipoteza că informația genetică a organismelor se găsește înregistrată biochimic în aceste molecule, sub forma unor anumite secvențe de nucleotide.

Experiențele genetice mai vechi au sugerat că fiecare aminoacid este codificat de un număr mic de nucleotide succesive din ADN.

G. Gamov (1955) a emis ipoteza, după care, în macromoleculele acizilor nucleici se găsește codificată biochimic informația genetică necesară sintezei moleculelor de proteine.

Bazându-se pe faptul că în macromoleculele de ADN sunt patru tipuri de nucleotide ce conțin diferite baze pirimidinice și purinice, adenină (A), timină (T), guanină (G) și citozină (C), care se pot succede într-un număr foarte mare de moduri, iar în macromolecula proteică, sunt 20 de tipuri de aminoacizi care, de asemenea, se pot succede într-un număr foarte mare de moduri, codificarea celor 20 de tipuri de aminoacizi nu se poate realiza de către un singur nucleotid ($4^1 = 4$) sau de către două nucleotide ($4^2 = 16$), deoarece numărul combinațiilor este mai mic decât numărul aminoacizilor.

De aceea, s-a ajuns la concluzia că numai combinații de câte trei nucleotide ($4^3 = 64$) pot realiza codificarea celor 20 de aminoacizi, deoarece numărul

de combinații depășește pe cel al aminoacizilor.

Macromoleculele de acizi nucleici conțin un număr mare de nucleotide, astfel că, prin modificarea secvenței acestora, se poate înregistra o mare cantitate de informație genetică.

În celula mamiferelor, de găsesc 500000–600000 de macromolecule de ADN, fiecare macromoleculă fiind formată din cel puțin 10000 de nucleotide. De aici rezultă că posibilitățile de înregistrare codificată a informației genetice a ADN din celula mamiferelor sunt foarte mari.

Informația genetică este codificată în ADN, sau în cazul unor virusuri, în ARN, sub forma unei secvențe de trei nucleotide, în *cuvinte de cod* sau *codoni*. Prin procesul de transcripție, informația genetică este transferată la ARNm și apoi, prin translație, este transformată într-o secvență de 20 de tipuri de aminoacizi în catena polipeptidică.

Pe baza cercetărilor întreprinse de M. Nirenberg, H. Matthaei, H.G. Khorana și S.Ochoa, în anul 1965, s-a reușit identificarea tuturor cuvintelor de cod (*codonilor*) ale aminoacizilor, în sensul că sunt cunoscute toate tripletele de nucleotide (codonii) din ARNm ce codifică diferiții aminoacizi.

Acești codoni sunt formați din patru tipuri diferite de nucleotide ce conțin bazele pirimidinice și purinice, adenină (A), uracil (U), guanină (G) și citozină (C).

Adevăratul cod genetic conținut în macromolecula de AND poate fi ușor cunoscut prin înlocuirea nucleotidelor din ARNm cu complementul lor, și anume: citozina (C) prin guanină (G), guanina (G) prin citozină (C), adenina (A) prin timină (T) și uracilul (U) prin adenină (A).

În total există un număr de 64 de codoni, dintre care numai 61 corespund diferiților aminoacizi (Tabelul 7.1.).

Codonii *ocru* și *ambră* (UAA și UAG) nu corespund nici unui aminoacid, ei indicând sfârșitul catenei polipeptidice în curs de sinteză.

Codonul azur (UGA) nu codifică nici un aminoacid (codon nonsens sau stop), el având rolul de a separa genele în cadrul unui mesaj genetic policistronic.

Codonii AUG și GUG marchează începutul unei catene polipeptidice, în

care este încorporată formilmetionina (cel puțin la *Escherichia coli*) [5].

Codul genetic (tabelul 9.2.) are patru caracteristici importante:

1) Pentru a indica capătul unui codon sau începutul următorului, nu este necesar nici un semn de punctuație.

De aceea, cadrul de citire trebuie așezat corect la începutul moleculei de ARNm și apoi deplasat secvențial de la un triplet la altul, altfel toți codonii ar fi defazați, rezultând o proteină cu o sec-vență de aminoacizi eronată.

Acest fapt presupune necesitatea existenței în ARNm a unei forme de semnal unic care să indice punctul corect de începere a citirii de către ribozomi.

2) Codul aminoacizilor este degenerat, ceea ce înseamnă că există mai mult de un cuvânt de cod (codon) pentru cei mai mulți dintre aminoacizi. Caracterul degenerat al codului nu este uniform.

Astfel, codul pentru arginină, leucină și serină este degenerat de șase ori pentru fiecare aminoacid menționat, în timp ce codul pentru alți aminoacizi: alanina, glicina, prolina, tirozina și valina este degenerat de patru ori etc.

3) Așa cum se observă din tabelul 9.1., acolo unde numărul codonilor pentru un aminoacid este mai mare de unu, primele două litere dintr-un codon pentru un aminoacid sunt aceleași, diferențierile făcându-se la a treia bază, care este mai puțin specifică.

Se abat de la această regulă arginina, leucina și serina la care sunt diferențieri și la prima bază. Este știut că primele două litere din fiecare codon sunt determinanții principali ai specificității.

A treia poziție, oscilantă și labilă, conține nucleotidul de la capătul 3' din codon (F.H. Crick) [2].

4) Dintre cele 64 de triplete ale codului genetic, trei nu codifică nici un aminoacid (UAG, UAA și UGA) așa cum s-a arătat mai sus.

În cazuri rare, nu ADN servește drept matriță pentru sinteza ARN, ci invers. H.M. Temin a dovedit că unele virusuri sunt capabile să determine sinteza unui ADN care este integrat în cromozomii celulei gazdă și provoacă transformarea sa malignă [5].

Tabelul 9.1.

Caracterul degenerat al codului aminoacizilor

A.A.	Nr. de codoni	Codonii	A.A.	Nr. de codoni	Codonii
Trp	1	UGG	Tyr	2	UAU, UAC
Met	1	AUG	Ile	3	AUU, AUC, AUA
Asn	2	AAU, AAC	Ala	4	GCU, GCC, GCA, GAG
Asp	2	GAU, GAC	Gly	4	GGU, GGC, GGA, GGG
Cys	2	UGU, UGC	Pro	4	CCU, CCC, CCA, CCG
Gln	2	CAA, CAG	Thr	4	ACU, ACC, ACA, ACG
Glu	2	GAA, GAG	Val	4	GUU, GUC, GUA, GUG
His	2	CAU, CAC	Arg	6	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Lys	2	AAA, AA	Leu	6	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Phe	2	UUU, UUC	Ser	6	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC

Tabelul 9.2.

Codul genetic (ARN) sau Dicționarul cuvintelor de cod

Primul nucleotid al codonului (5')	Al doilea nucleotid al codonului				Al treilea nucleotid al codonului (3')
	U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA ocr	UGA azur	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG ambră	UGG Trp	G

C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GGA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

De exemplu, virusul care provoacă sarcomul aviar necesită pentru replicarea sa ADN. S-a dovedit că ARN viral este complementar cu o regiune a ADN celular. Aceasta înseamnă că ARN viral acționează ca matriță pentru ADN. În aceste cazuri, transferul de informație se realizează în sensul ARN → ADN [5].

Cuvintele de cod prezentate în tabelul 9.2. sunt considerate, în prezent, din punct de vedere biologic, ca universale. Ele sunt identice la *E. Coli*, virusul mozaicului tutunului, la om și la alte vertebrate și la un număr mare de bacteriofagi.

9.5.1. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA CODULUI GENETIC

Apariția materialului genetic a avut loc în mai multe etape, care coincid cu apariția vieții pe Pământ.

Se presupune că Pământul s-a format acum 4800 milioane de ani prin condensarea unui nor de gaze și praf, mai ales din elemente radioactive, care prin

descompunerea lor, în interiorul Pământului, au generat multă căldură și activități vulcanice.

Atmosfera străveche, cu aproximativ 4000 milioane de ani în urmă, care provenea parțial din interiorul Pământului, conținea probabil mult azot, era bogată în hidrogen, metan, amoniac și apă.

Este foarte posibil ca în perioada apariției vieții, atmosfera să fi fost puternic reducătoare și total lipsită de oxigen. Oxigenul a apărut mult mai târziu, în mare parte, ca produs al biosintezei.

Concentrația oxigenului atmosferic a atins procentul de 1% abia acum 600–1000 milioane de ani și de 10 % acum 400 milioane de ani.

Numeroase date susțin că o serie de compuși organici au provenit, la început, din reacțiile dintre diferiți compuși anorganici, sub influența radiațiilor solare, a razelor ultraviolete, a descărcărilor electrice, a variațiilor de temperatură etc.

În această perioadă, au apărut biomoleculele primordiale (30–40 de tipuri) împreună cu alți compuși organici: aminoacizi, baze azotate, acizi organici, zaharuri. Acești compuși organici s-au acumulat treptat în marea primitivă.

Această perioadă veche, numită perioada de evoluție chimică, a durat cam 1500 milioane de ani, adică cam o treime din istoria Pământului.

Mai târziu, în această perioadă, astfel de molecule organice au suferit condensări abiotice, formând polipeptide primitive, polinucleotide, polizaharide și lipide. Din amestecul de molecule organice și polimeri, acumulat în apele oceanelor, mărilor și în apele interioare, se presupune că s-au format primele organisme vii.

Polipeptidele primitive, protenoidale, au fost substanțe proteice foarte simple, cu o greutate moleculară de până la 10000 și care manifestau chiar unele activități catalitice.

Intr-o etapă următoare, a avut loc sinteza proteinelor și a polinucleotidelor, mai întâi neenzimatic și apoi catalizate de enzime.

Din interacțiunea acizilor nucleici cu proteinele s-au format complexe mai stabile. În prezent, materialul genetic se găsește strâns legat de proteine, iar informația genetică este translată în proteine.

În cadrul acestui complex de nucleoproteine, acizii nucleici și-au asumat rolul de matriță datorită stabilității lor chimice relativ mai mari, iar proteinele care s-au dovedit a avea o capacitate reactivă mai mare, au avut rol structural și enzimatic, contribuind substanțial la mărirea complexității moleculelor în evoluție. În timp, a apărut primul organism viu, care, în esență, a reprezentat un sistem de proteine, ale căror menținere și continuitate au depins de informația genetică din acizii nucleici [5].

S-a demonstrat, experimental, că în atmosfera primitivă a Pământului s-au putut sintetiza adenina și uracilul și că din moleculele de amoniac și acid cianhidric este posibilă sinteza abiogenă a bazelor azotoase purinice și pirimidinice, care intră în structura acizilor nucleici.

S-a reușit polimerizarea nucleotidelor în absența enzimelor, folosindu-se agenți care produc dehidrogenarea, în mediu uscat.

A. Rich a considerat că viața a apărut în momentul când a început sinteza polinucleotidelor cu o anumită secvențialitate de nucleotide, în conexiune cu sinteza polipeptidelor cu o secvență corespunzătoare a aminoacizilor.

Existența actuală a două tipuri de acizi nucleici (ADN și ARN) foarte asemănătoare, duce la ipoteza că ei au avut un precursor comun.

Diferențierea lor a avut loc, probabil, în cursul evoluției, în sensul că ADN, mai stabil, a devenit material genetic și ARN, mai puțin stabil, a avut rol în procesul de transcripție și translație a informației genetice [5].

Codul genetic, până să ajungă la forma actuală, a suferit un proces de evoluție îndelungat. Inițial, probabil că tripletele de nucleotide nu aveau o semnificație precisă, diferiți aminoacizi având șanse egale de a fi încorporați în catena polipeptidică.

Între acest moment și cel în care o anumită tripletă a determinat încorporarea unui singur aminoacid, au existat probabil mai multe momente intermediare.

C.R. Woese susține că în procesul de evoluție a codului genetic, selecția a operat asupra celulelor și nu asupra moleculelor de acizi nucleici. În cursul evoluției, au fost selecționate celulele la care s-a produs limitarea răspunsului la o anumită tripletă și, ca urmare, a avut loc sinteza anumitor prote-

ine, mai ales a acelor cu rol enzimatic.

Pentru a da o explicație experimentală a modului cum a evoluat codul genetic, C.R. Woese a studiat diverse cazuri în care celulele comit erori de translație, încorporând un alt aminoacid în locul celui normal, când se sintetizează proteine mutante. Erorile de translație pot crește prin mărirea concentrației în ioni de Mg^{2+} , la pH ridicat, la variația temperaturii, utilizarea de analogi ai bazelor purinice sau pirimidinice etc.

Astfel, tripleta citozină-adenină-uracil (CAU) codifică histidina, însă din greșeală, poate fi încorporată glutamina care este codificată de tripleta citozină-adenină-adenină (CAA). S-a constatat că poziția III din tripletă este cel mai frecvent afectată de erori de traducere, ea manifestând gradul maxim de degerescență în cod.

Poziția I din tripleta de nucleotide ocupă locul următor în ceea ce privește susceptibilitatea la o citire greșită. În acest caz se produce încorporarea unui aminoacid înrudit, fără ca această eroare să aibă urmări grave asupra organismului.

Poziția a II-a din tripleta de nucleotide este cea mai specifică unui codon și cea mai puțin supusă erorilor de translație. O eroare în poziția II determină o translație complet greșită, care va avea urmări grave.

Se poate concluziona că ipoteza lui C.R. Woese privind apariția și evoluția codului genetic se bazează pe ideea că mecanismul de translație este rezultatul unei evoluții care se datorește selecției.

F.A.C. Crick pornește de la premiza că, într-o fază mai primitivă, numărul de aminoacizi și de triplete era mai redus. Mai târziu, încorporarea unui nou aminoacid în proteine și codificarea sa în cadrul codului genetic s-a realizat numai în măsura în care acestea prezentau un avantaj selectiv. Codul genetic s-a definitivat atunci când numărul și structura proteinelor au devenit atât de specifice, încât orice adăugare ulterioară de aminoacizi nu mai prezenta nici un avantaj pentru selecție.

Conținutul mesajului genetic al organismelor s-a schimbat mereu pe calea recombinării genetice, care s-a realizat prin redistribuirea cromozomilor sau prin schimbul de material genetic între cromozomii omologi la organisme

superioare și prin recombinarea genelor la cele cu un cromozom, cum sunt bacteriile [5].

Prin recombinare genetică și selecție naturală, se creează o mai bună adaptare la mediu a organismelor.

O altă cale de modificare a mesajului genetic o constituie mutațiile care sunt provocate de accidente la nivelul ADN în cursul replicației sale. Cauzele pot fi fizice (radiații, rupturi mecanice în interiorul celulei, nondisjunția cromozomilor), chimice (alterarea, substituția sau eliminarea unor baze purinice sau pirimidinice, alterarea scheletului ADN, intercalarea unor compuși aromatici oligociclici în ADN) și enzimatică (erori ale sistemului de replicare, de recombinare, modificarea unor enzime reparatoare ale catenelor ADN).

9.6. PURIFICAREA PROTEINELOR

În vederea folosirii, orice produs chimic și, mai ales, farmaceutic, natural sau obținut pe cale de sinteză, este supus unor operații ce pot consta din:

- operații primare de filtrare, centrifugare, sedimentare sau decantare;
- separări prin extracție cu solvenți, adsorbție, precipitare, ultrafiltrare;
- purificare prin precipitare fracționată, cromatografie și cristalizare.

De obicei sunt aplicate grupuri de operații variate de purificare.

Extracția cu solvent, lichid-lichid este o tehnică importantă pentru obținerea unui mare număr de produse naturale la fermentarea bulioanelor. Exemple de produse care sunt obținute prin extracția cu solvent sunt: etanol, acid lactic, acid citric, penicilină G., cefalosporină, streptomycină, vitamina B, riboflavină. Solventul este astfel ales pentru a înlesni selectarea și separarea cât mai bună a produsului în această fază.

Extracția cu fluid supercritic. Fluidele, dincolo de temperatura și presiunea lor critică, se numesc fluide supercritice. Dioxidul de carbon a fost în cea mai mare măsură utilizat ca fluid supercritic pentru extracție în industria alimentară, dar și în alte sectoare cum ar fi cel farmaceutic. Costurile acestei tehnici împiedică, însă, extinderea aplicațiilor sale.

Metode bazate pe membrane. Calea de alegere a membranelor este, în prin-

cipal, criteriul prin care membranele separă moleculele. Pentru moleculele cu diametre în jur de 10Å–1000Å ultrafiltrarea poate fi folosită pentru concentrare și separare. Membranele compozite produc cele mai bune rețineri. Selecția membranelor are la bază, în primul rând, masa moleculelor ce urmează a fi separate

Prevaporizarea constă într-o sorbție selectivă a unui lichid într-o membrană, difuzia lichidului prin membrană și conversia sa în fază de vapori pe cealaltă față a membranei, produsă prin aplicarea vacuumului. Este un proces intensiv de energie care poate separa lichidele. Selectivitatea, un înalt coeficient de difuzie și rezistența mecanică sunt trei caracteristici ale acestor membrane.

Metodele cromatografice sunt indispensabile pentru izolarea produselor de înaltă puritate. Cromatografia de adsorbție pe silicagel sau alumină (trioxid de aluminiu) s-a practicat de chimiștii organicieni de zeci de ani. Adsorbanții sintetici neionogeni, ca rășinile de polistiren și rășinile de metacrilati se folosesc, de asemenea, pentru variate aplicații. Cromatografia cu schimbători de ioni are aplicații multilaterale.

Practica curentă de purificare a proteinelor se poate divide în: metode cromatografice și necromatografice.

Metodele cromatografice au o înaltă rezoluție și sunt costisitoare.

Tabelul 9.3. cuprinde diferitele metode de cromatografie existente în prezent. Metodele necromatografice (Tabelul 9.4.) nu sunt tot așa de ușor de executat ca metodele cromatografice, sunt mai puțin precise și se realizează la un cost mai scăzut.

În ultimul timp, s-au făcut eforturi de reducere a numărului de procese pentru purificarea proteinelor. Cele mai multe se bazează pe înalta selectivitate a afinității unor liganzi la legarea moleculelor proteice.

Cromatografia în strat expandat permite procesarea directă a suspensiilor brute. Ea utilizează un strat fluidizat dar proprietățile hidrodinamice ale mediului cromatografic sunt asemenea ca ale unui strat compact. Materialele suspendate trec prin spațiile dintre particule și proteinele pot fi captate din mediu.

Tabelul 9.3.

Diferitele metode cromatografice utilizate

Cromatografia cu schimbători de ioni
 Cromatografia pe bază de interacțiuni hidrofobe
 Cromatografia cu hidroxiapatită
 Cromatografia de afinitate cu metal imobilizat
 Cromatografia cu interacțiune tiofilică
 Cromatografia de inducție cu încărcare hidrofobă
 Cromatografia cu procedeu mixt de schimbători de ioni
 Cromatografia de afinitate
 Cromatografia de substituție

Tabelul 9.4.

Metode necromatografice

Precipitarea la punctul izoelectric
 Precipitarea cu săruri, polimeri, solvenți organici, surfactanți, ioni metalici
 Separarea a două faze apoase
 Trei faze de separare
 Cristalizarea
 Ultrafiltrarea

Cromatografia în strat expandat poate fi realizată pe calea cromatografiei cu schimbători de ioni, a cromatografiei cu interacțiune hidrofobă sau a cromatografiei de afinitate. Avantajele cromatografiei în strat expandat valoarea de tulburare, purificarea tehnică se combină cu clarificarea și concentrarea.

Cromatografia de afinitate a ionilor metalici imobilizați. Această metodă cromatografică folosește afinitatea ionilor metalici ca: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} față de resturile de histidină, triptofa, fenilalanină, tirozină prezente la suprafața proteinelor.

Poziția acestor resturi și alte proprietăți ale suprafeței proteinelor contribuie, de asemenea, la regimul de reținere a proteinelor în coloana cromatogra-

fică. Ionul metalic este coordonat la ligandul chelatic (doi din cei mai folosiți liganzi sunt acidul iminodiacetic și acidul ntrolotriacetic) care este legat la un suport uzual (agaroza este cea mai folosită).

Afinitatea la precipitare. Această tehnică se bazează pe faptul că unii polimeri solubili în apă pot fi conjugați la o afinitate adecvată a ligandului. Complexul de afinitate format poate precipita din soluție. Proteina poate fi recuperată din acest complex de afinitate folosind cromatografia de afinitate.

Afinitatea ligandului facilitează trei faze de repartiție. Sub acest nume este cunoscută o altă tehnică de precipitare care exploatează sinergetic o sare și un solvent organic la precipitarea proteinelor. Adăugarea sulfatului de amoniu și t-butanol la o proteină crează trei faze: o fază în partea superioară bogată în t-butanol, o fază apoasă inferioară și un precipitat interfacial proteic. Precipitarea în trei faze a fost, în mare măsură, folosită pentru purificarea unui mare număr de proteine.

Separări pe bază de membrană. Îndepărtarea substanțelor cu moleculă mică din soluțiile proteice sau din suspensii prin dializă este cel mai obișnuit și mai vechi exemplu de folosire a membranelor pentru purificarea proteinelor.

Microfiltrarea efectuată la presiunea de 0,1–1,0 bari reține particule cu mărimea de 0,1–10 μm și este folositoare, de exemplu, la îndepărtarea resturilor celulare din proba de proteină.

Ultrafiltrarea la presiune ridicată, de 0,5–10 bari poate separa proteinele între ele.

Bibliografie selectivă

1. Lehninger A.L., *Biochimie*, vol.I și II, Editura Tehnică, București, 1992
2. Nenișescu C.D., *Chimie Organică*, Vol. I și II, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1988
3. Diculescu I., Onicescu D., Benga Gh., Popescu L.M., *Biologie Celulară*, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 1983
4. Ceapoiu N., *Genetica și Evoluția Populațiilor Biologice*, Ed. Academiei Române, București, 1976
5. Ionescu – Varo M., *Biologie celulară*, Ed. Did. și Pedagogică, București, 1976
6. Lehninger A.L., *Biochemie*, 3. Auflage. Springer-Lehrbuch, Berlin, 2001
7. Donald Voet et al, *Lehrbuch der Biochimie*, Wley – VCH, 2012
8. Berg J.M., Stryer ., *Biochemie*, 5 Auflage, Spektrum Akad. Verlag, 2013
9. Nelson D.L., Cox M.M., Lehninger A.L., *Principles of Biochemistry*, 4th Edition, Palgrave Macmillan, 2004
10. Christen Ph., Jaussi R., *Biochemie*, Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten, Springer – Verlag, 2005
11. Karlson P., *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14 Auflage, Thieme, Stuttgart, 2005
12. Horn F. Et al., *Biochemie des Menschen – Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 3., vollst. Überarb. U. Erw. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2005
13. Graeme K. Hunter, *Vital Forces, The discovery of the molecular basis of life*, Academic Press, London, 2000
14. Rasso J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R., *Biochemie*, Georg Thieme Verlag, 2006
15. Raicu P., Ionescu-Varo M., Gancevici G., Moisescu G., *Celula*, Ed. Academiei, București, 1972
16. Campbell N.A., Reece J.B., *Biologie*, traduit par Mathieu R., Ed. Editions du Renouveau Pédagogique Inc., Saint Laurent (Québec), 2004
17. Ogle J.M., Broderson D.E., Clemons W.M., Tarry M.J., Carter A.P., Ramakrishnan V., *Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution*, Science, 292(5518), 2001
18. Khalyfa A., Bourbeau D., Chen E., Petroulakis E., Pan J., Xu S., Wang E., J. Biol. Chem., 276 (25), 2001
19. Verrall M., (ed), *Downstream Processing of Natural Products*, Chichester, John Wiley, 1996
20. Thornton J.D., (ed), *Science and Practice of Liquid-liquid Extraction*, Oxford, Oxford University Press, 1992
21. Mc Gray K.P., Kaplan D.L., *Protein-based materials*, Boston, Birkhäuser, 1997
22. Bailey J.E., Ollis D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, Singapore, McGraw-Hill, 1986
23. Lutz H., Raghunath B., *Ultrafiltration process design and implementation*, in : Shukla A.A., Etzel M.R., Gadam S. (eds), *Process Scale Bioseparation for the Biopharmaceutical industry*, Boca Raton, FL, CRC Press, 2007
24. Liu Z., Hagan N.D., Higgins T.J.V., *Proteins*, Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition), Vol.2, 2017
25. Pohl S., Hasilik A., *Biosynthesis, targeting, and processing of lysosomal proteins: Pulse-chase labeling and immune precipitation*, Methods in Cell Biology, Chapter 4, Vol. 126, 2015
26. Ramshaw J.A.M., Werkmeister J.A., *Recombinant Proteins as Emerging Biomaterials*, Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, 2016
27. Lijuan Zhang, *Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins*, Progress in Molecular Biology and Translational Science, Vol. 93, 2010
28. Skakauskas V., Katauskis P., Skvortsov A., Gray P., *Toxin effect on protein biosynthesis in eukaryotic cells: A simple kinetic model*, Mathematical Biosciences, Vol.261, 2015
29. Kawakatsu T., Takaiwa F., *Proteins*, Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition), Volume 2, 2017
30. Murray J.E., Laurieri N., Delgoda R., *Proteins*, Chapter 4, Pharmacognosy, Fundamentals, Applications and Strategies, 2017
31. <http://www.proteinsynthesis.org/protein-synthesis/>, 2016

32. Clark P.D., Pazdernik N.J., *Recombinant Proteins*, Biotechnology (Second Edition), AP Cell, 2016
33. Palmer T., Bonner P.L., *The Biosynthesis and Properties of Proteins*, Enzymes (Second Edition), Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry, 2014

CAPITOLUL 10

10. PROTEINE

10.1.	Considerații generale	720
10.2.	Fundamentul structurii proteinelor	734
10.3.	Structura proteinelor	740
10.3.1.	Determinarea succesiunii aminoacizilor	742
10.4.	Funcțiile biologice ale proteinelor	750
10.5.	Denaturarea proteinelor	751
10.6.	Stabilitatea și funcțiile proteinelor	752
10.7.	Proteine mai importante	755
10.7.1.	Proteine solubile	757
10.7.1.1.	Proteine de transport	768
10.7.1.2.	Proteine de transport a moleculelor și inonilor prin membranele celulare	795
10.7.2.	Proteine insolubile	803
10.7.3.	Proteide	804
10.8.	Separarea, purificarea și caracterizarea proteinelor	807
10.8.1.	Considerații generale	807
10.8.2.	Separarea proteinelor din amestecuri	811
10.8.3.	Extracția și purificarea proteinelor	815
10.8.4.	Caracterizarea moleculelor de proteine	815
	<i>Bibliografie</i>	815

10.1. CONSIDERAȚII GENERALE

Proteinele sunt produși cu structură macromoleculară de natură polipeptidică care, prin hidroliză, conduc la amestecuri de α -aminoacizi.

În constituția proteinelor naturale intră un număr de circa 30 de aminoacizi, dintre care, în mod obișnuit, 20 sunt considerați a fi fundamentali, aceiași la toate formele de viață, de la bacterii și până la om.

Prin legarea aminoacizilor în lanțuri polipeptidice, variate ca lungime și ca succesiune a unităților, se realizează un număr extrem de mare de combinații. Socotind că există peste 1,5 milioane de specii de organisme vii, se poate aprecia că acestea au împreună 10^{10} – 10^{12} diferite tipuri de proteine, care după compoziția lor în aminoacizi pot fi considerate substanțe organice de o mare simplitate.

Toate proteinele au în compoziție carbon, hidrogen, azot și oxigen. Multe proteine conțin sulf, iar unele conțin și alte elemente și mai ales fosfor, fier, zinc, cupru.

În moleculele de proteine aminoacizii sunt legați între ei prin legături peptidice, între grupările aminice ale unor aminoacizi și grupările carboxilice ale altor aminoacizi, formând lanțuri lungi neramificate. Aceste macromolecule, numite polipeptide, pot conține sute de resturi de aminoacizi.

Unele proteine conțin un singur lanț polipeptidic, altele două sau mai multe. Lanțurile polipeptidice ale unei proteine nu sunt polimeri întâmplători, de lungimi nedefinite; fiecare lanț polipeptidic având masa moleculară, compoziția chimică, ordinea secvențială a aminoacizilor componenți și structura tridimensională bine definite.

Proteinele cu două sau mai multe lanțuri polipeptidice se numesc proteine *oligomere*; lanțurile lor componente se numesc *subunități* sau *protomeri*.

O proteină oligomeră, de exemplu, este hemoglobina, formată din patru lanțuri polipeptidice, care se îmbină între ele formând un ansamblu compact foarte stabil, cu toate că lanțurile polipeptidice nu sunt legate prin legături covalente. Proteinele oligomere conțin, de obicei, un număr egal de lanțuri

polipeptidice identice sau diferite ca lungime sau ca secvență a aminoacizilor. La proteinele oligomere mici pot exista două până la douăsprezece subunități.

Proteinele reprezintă circa 50%, de obicei mai mult, din masa uscată a celulelor. Ele se găsesc în orice parte a oricărei celule, deoarece sunt esențiale pentru toate aspectele structurii și funcțiilor celulare.

Există diferite tipuri de proteine, fiecare specializată pentru o anumită funcție biologică. De asemenea, cea mai mare parte a informației genetice este exprimată prin proteine. Structura moleculelor proteice, relația acestora cu activitatea și funcția lor biologică sunt probleme de mare însemnătate pentru biochimie [3].

Proteinele sunt componentele esențiale alături de apă, săruri anorganice, lipide, hidrați de carbon, acizi nucleici, vitamine și enzime etc., ale materialelor lichide și gelificate din celulele, în care au loc interacțiuni fizico-chimice intense, cuprinse sub denumirea de viață.

Proteinele se deosebesc de celelalte componente ale celulelor prin proprietăți unice, îndeplinind funcții fundamentale, specifice organismelor vii, cum sunt:

- rol structural major, constituind materialul din care sunt construite toate structurile celulare, membrane, organite celulare, ca și materialul intercelular al țesuturilor și organelor;
- substanța contractilă a fibrelor musculare, cilia și flagellele organismelor inferioare, care posedă capacitatea remarcabilă de a transforma energia chimică în energie mecanică;
- enzimele exercită acțiuni catalitice ale reacțiilor biochimice;
- îndeplinesc funcții de transport și de stocare a ionilor metalici, vitamine, oxigen etc.;
- codificarea, conservarea și duplicarea informației genetice etc.

Proteinele care asigură aceste funcțiuni se bucură de o proprietate neîntâlnită la alte combinații: *specificitatea*.

Proteinele sunt macromolecule informaționale, cu secvențe specifice de aminoacizi și sunt expresia epigenetică a genomului celular.

Proteinele diferitelor specii de animale și vegetale sunt tipice pentru aceste specii, deosebindu-se de acelea ale altor specii. Uneori, se observă deosebiri chiar între proteinele indivizilor aceleiași specii, ceea ce face ca numărul compușilor proteici naturali să fie extrem de mare. De aceea, sistematizarea proteinelor este greu de realizat și adesea este arbitrară, bazându-se pe unele caracteristici și ignorându-le pe altele.

Proteinele se împart, după compoziția lor, în *proteine simple*, care la hidroliză dau numai aminoacizi și conțin 50% carbon, 7% hidrogen, 23% oxigen, 16% azot, 0–3% sulf și *proteine conjugate* care dau, prin hidroliză, aminoacizi și alți compuși organici sau anorganici, numiți *grupări prostetice*. După natura chimică a grupării prostetice, proteinele conjugate se pot grupa în: *nucleoproteine*, *glicoproteine*, *fosfoproteine*, *hemoproteine*, *flavoproteine*, *metaloproteine* (tabelul 10.1.).

Masa moleculară a proteinelor poate fi cuprinsă între 10000 Da (limită inferioară admisă arbitrar) și un milion sau mai mult.

Multe proteine sunt formate din două sau mai multe lanțuri polipeptidice, fiecare lanț conținând până la 300 sau chiar mai mulți aminoacizi.

În funcție de conformația lor, proteinele pot fi grupate în două mari clase: *fibrilare* și *globulare*.

Din clasa proteinelor simple sau a holoproteinelor, se disting pe baza solubilității în apă, două categorii: *proteine ușor solubile* (de regulă proteine intracelulare) și *proteine insolubile* (uzual extracelulare, cu roluri de susținere).

Proteinele insolubile în apă, numite *scleroproteine* sau *proteine fibroase*, se găsesc în organismul animal în stare solidă și au rolul de a conferi organelor rezistență mecanică.

Proteinele fibrilare sunt formate din lanțuri polipeptidice aranjate paralel, în jurul unei singure axe, dând naștere la filamente sau foi.

Proteinele fibrilare sunt rezistente fizic și insolubile în apă și în soluții saline diluate. Scleroproteinele se dizolvă în acizi și baze concentrate, când are loc și o degradare a structurii acestora.

Ele reprezintă elementele structurale de bază a țesuturilor conjunctive ale animalelor superioare. Exemple sunt: colagenul, α -keratina, elastina, reticulina,

care sunt tratate în volumul al III-lea al tratatului de biomolecule.

Proteinele fibrilare sunt formate din lanțuri polipeptidice aranjate paralel, unele față de altele, în jurul unei axe, dând naștere la filamente sau foi (Fig.10.1.).

Tabelul 10.1.

Proteine conjugate		
Clasa	Gruparea prostetică	Procente în greutate
<i>Nucleoproteine</i>		
Ribozomi	ARN	50 – 60
Virusul mozaicului tutunului	ARN	5
<i>Lipoproteine</i>		
β_1 - Lipoproteine plasmatic	Fosfolipide, colesterol, lipide neutre	79
<i>Glicoproteine</i>		
γ - Globulină	Hexozamină, galactoză manoză, acid sialic	2
<i>Fosfoproteine</i>		
Cazeina	Fosfați esterificați cu radicali de serină	4
<i>Hemoproteine</i>		
Hemoglobină	Fier protoporfirinic	4
Citocrom c	Fier protoporfirinic	4
Catalază	Fier protoporfirinic	3,1
<i>Flavoproteine</i>		
Succinat dehidrogenază	Flavin – adenin dinucleotid	2
D – Aminoacid oxidază	Flavin – adenin dinucleotid	2
<i>Metaloproteine</i>		
Feritină	Fe(OH) ₃	23
Citocrom c oxidază	Fe și Ca	0,3
Alcool dehidrogenază	Zn	0,3
Xantin oxidază	Mo și Fe	0,4

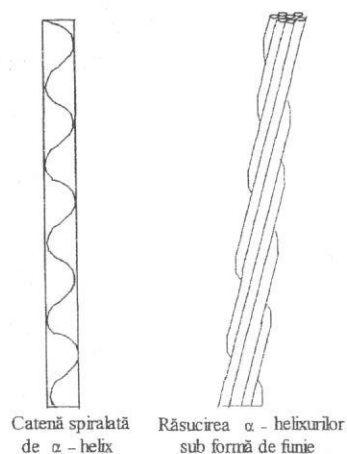


Fig. 10.1. Formă de aranjare paralelă a lanțurilor polipeptidice în lungul unei axe dând naștere la filamente.

Proteinele solubile în apă sau *globulare* apar în celule în stare dizolvată sau sub formă de geluri hidratate.

În celule, proteinele globulare au o funcție mobilă sau dinamică.

Dintre cele circa 2000 de enzime cunoscute, aproape toate sunt proteine globulare, de asemenea anticorpii, unii hormoni și o serie de proteine cu rol de transport, cum sunt *albumina serică* și *hemoglobina*.

La proteinele globulare lanțurile polipeptidice sunt pliate compact în forme sferice sau globulare (Fig.10.2.).

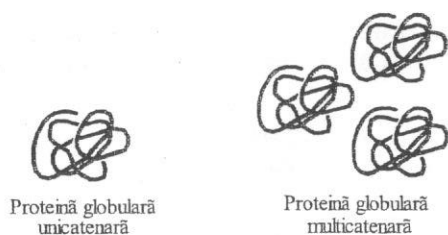


Fig. 10.2. Lanțuri polipeptidice aranjate în formă globulară compactă în proteinele globulare. Porțiuni scurte din lanțurile polipeptidice pot avea o răsucire regulată în spirală sau structură în zig-zag.

O *proteină globulară* sau *globulină* sau *sferoproteină* este una dintre cele două clase principale de proteine și cuprinde proteinele de formă globulară, care sunt, mai mult sau mai puțin, solubile în mediu apos și formează soluții coloidale. Solubilitatea în apă sau în soluții diluate de săruri neutre este prima caracteristică care permite a le distinge de proteinele fibroase.

La proteinele globulare, lanțurile polipeptidice sunt pliate compact în forme sferice sau globulare. În celule, de obicei, proteinele globulare au o funcție mobilă.

Aproape toate *enzimele* sunt proteine globulare. De asemenea, *proteinele de rezervă* (ovalbumina, cazeina, glutenina etc.), *proteinele cu rol de transport* (hemoglobina, mioglobina, albumina serică etc.), *proteinele cu rol de protecție din sângele vertebratelor* (anticorpii, fibrinogenul, trombina), unii *hormoni*, *toxinele*, *anticorpii*, sunt proteine globulare.

Unele proteine pot fi clasificate între proteinele globulare și cele fibrilare, deoarece seamănă cu proteinele fibrilare în ceea ce privește structura lor de baghete lungi și cu cele globulare datorită solubilizării în soluții apoase salin. Astfel este *miozina*, element structural al mușchiului, și *fibrinogenul*, element structural al cheagului sanguin.

Uneori, un grup de proteine, care funcționează împreună, se găsesc în celulă sub forma unui *cluster* sau a unui *complex* care poate fi izolat în stare omogenă. Astfel, un cluster format din molecule înrudite funcțional, numit *ansamblu* sau *complex supramolecular* este *complexul acid gras sintetaza*, care conține câte o moleculă din șapte enzime diferite necesare pentru biosinteza acizilor grași.

Cele mai mari complexe proteice supramoleculare sunt *virusurile*, *complexe de proteine* și *acizi nucleici*. Unele virusuri conțin și lipide și ioni metalici. *Virusul mozaicului tutunului*, unul dintre cele mai mici virusuri, are o masă moleculară de aproape 40 milioane, din care aproximativ 5%, adică 2 milioane, constă din acid ribonucleic, iar restul de 38 milioane este partea proteică constituită din 2–200 lanțuri polipeptidice identice.

După compoziția lor chimică, proteinele se împart în două clase principale:

simple și *conjugate*. Proteinele simple, la hidroliză, dau aminoacizi și nici un alt compus organic sau anorganic. Proteidele sau proteinele conjugate, sunt combinații ale unei proteine cu o componentă neproteică (*grupare prostetică*).

În funcție de natura grupării prostetice se disting următoarele clase de proteine (tabelul 10.2):

Tabelul 10.2.

Grupările prostetice de la unele clase de proteine

Clasa	Gruparea prostetică:
– <i>Fosfoproteine</i>	
Cazeina	Fosfați esterificați cu radicali de serină
– <i>Lipoproteine</i>	
β_1 -Lipoproteine	Fosfolipide, colesterol, lipide neutre
– <i>Glicoproteine</i>	
γ -Globulina	Hexozamină, galactoză, manoză, acid sialic
– <i>Nucleoproteine</i>	
Ribozomi	ARN
– <i>Hemoproteine</i>	
Hemoglobina	Fier protoporfirinic
Citocrom c	Fier protoporfirinic
Catalaza	Fier protoporfirinic
– <i>Flavoproteine</i>	
Succinat dehidrogenaza	Flavin-adenin dinucleotid
D-aminoacid oxidaza	Flavin-adenin dinucleotid
– <i>Metaloproteine</i>	
Feritina	$\text{Fe}(\text{OH})_3$
Citocrom c oxidaza	Fe și Ca
Alcooldehidrogenaza	Zn
Xantin oxidaza	Mo și Fe

Aceeași proteină poate cuprinde mai multe tipuri de grupări prostetice, combinând astfel și proprietățile caracteristice a mai multor clase de proteine conjugate.

Cele mai multe molecule proteice își păstrează activitatea biologică numai într-un interval limitat de temperatură și pH. Expunerea proteinelor solubile, globulare, la pH^{uri} extreme sau la temperaturi ridicate (peste $60^\circ\text{--}70^\circ\text{C}$), o perioadă scurtă de timp, produce, la majoritatea lor, o modificare fizică numită *denaturare*, prin care, efectul cel mai vizibil este scăderea solubilității.

La denaturarea printr-un tratament blând nu are loc ruperea legăturilor covalente ale scheletului, deci structura primară rămâne intactă.

Denaturarea înseamnă desfacerea structurii normale caracteristice lanțurilor polipeptidice din moleculele proteice. Când, de exemplu, la unele proteine globulare, cu creșterea temperaturii se produce desfacerea structurii pliate, formându-se lanțuri răsucite la întâmplare, proteina își pierde activitatea biologică.

Secvența aminoacizilor din lanțurile proteice determină conformația nativă a proteinei prin interacțiunile care se stabilesc între catenele laterale ale aminoacizilor, între acestea și solvent sau între acestea și alte substanțe dizolvate.

În unele cazuri, proteina denaturată revine spontan la forma sa nativă, biologic activă, are loc procesul de *renaturare*. De exemplu, în cazul unei enzime, activitatea ei catalitică revine prin renaturare, fără vreo modificare a specificității reacției catalitice. Prin renaturare nu iau naștere activități biologice noi. Aceasta este o dovadă că secvența de aminoacizi din lanțul polipeptidic conține informația necesară specificității conformației native și această conformație nativă determină activitatea biologică a proteinei.

În fiecare tip de proteină, lanțul polipeptidic este răsucit într-o conformație tridimensională specifică, necesară activității sau funcției ei biologice specifice.

Lanțurile polipeptidice ale proteinelor au, de obicei, o singură conformație în condiții biologice normale de temperatură și pH. Această conformație nativă, care conferă activitate biologică, este destul de stabilă pentru ca proteina să poată fi izolată și păstrată în stare nativă. Rezultă deci că legăturile simple din scheletul unei proteine native nu se pot roti liber.

W. Astbury a studiat primul, cu ajutorul razelor X, α -keratina și β -keratina și a ajuns la concluzia, pe baza spectrelor de difracție, că lanțurile polipeptidice ale acestor proteine au o anumită periodicitate sau o unitate care se repetă și că

lanțurile polipeptidice din α - și β -keratine sunt răsucite în mod diferit.

L. Pauling și R.B. Corey au făcut spectre de difracție cu raze X pentru cristale de aminoacizi și de di- și tripeptide, din care au dedus structura exactă a legăturii peptidice. Ei au găsit că distanța C-N din cadrul legăturii peptidice este mai mică decât în alte cazuri și au dedus că legătura C-N menționată are proprietățile unei duble legături, deci nu se poate roti liber.

Ei au ajuns la concluzia că cei patru atomi ai unei grupări peptidice și cei doi atomi de carbon α învecinați se află într-un singur plan, astfel încât atomul de oxigen al grupării carbonil și atomul de hidrogen al grupării -NH- se află în poziția trans (Fig.10.3.).

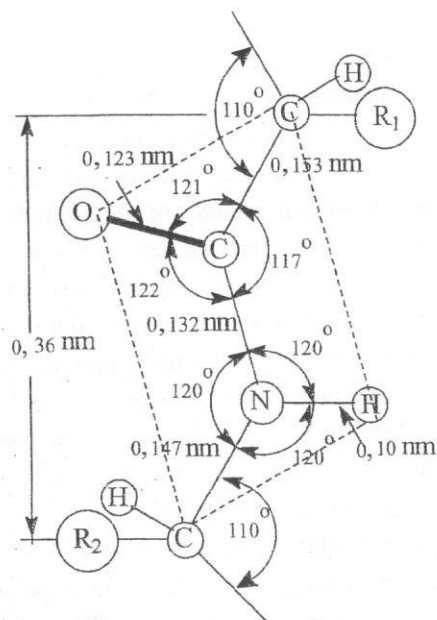


Fig.10.3. Dimensiunile grupării peptidice din analiza cu raze X. (reprodus după A.L.Lehninger, 1987).

Cei șase atomi dintre liniile punctate se află într-un plan. Deoarece legătura C-N centrală are un oarecare caracter de dublă legătură, acest plan tinde să fie rigid.

Structura α -helixului, găsită de L. Pauling și R.B. Corey este prezentată în volumul al III-a al Tratatului de biomolecule.

Este o spirală elicoidală cu aproximativ 3,6 aminoacizi pe spirală. Grupele R ale aminoacizilor sunt amplasate în afara elicei formată de scheletul polipeptidic. Într-o astfel de structură, unitatea care se repetă, constituită dintr-o singură răsucire completă a elicei, are aproximativ 0,54 nm (5,4 Å), în lungul axei lungi, corespunzând periodicității de 0,50 – 0,55 nm, deduse din spectrul de raze X al α -keratinelor.

O astfel de elice α (α -helix) permite formarea legăturilor de hidrogen intralanț între două spire consecutive ale elicei, paralel cu axa longitudinală a helixului; acestea sunt stabilite între atomul de hidrogen atașat la atomul de azot electronegativ al legăturii peptidice și oxigenul grupării carbonil al celui de al treilea aminoacid consecutiv.

Pauling și Corey au stabilit că α -keratinele constau din lanțuri polipeptidice dispuse în formă de α -helixuri răsucite spre dreapta.

Un lanț polipeptidic poate exista sub forma unui α -helix stabil numai dacă are o anumită compoziție în aminoacizi, care sunt ordonați în anumite secvențe.

Aminoacizii care concurează la formarea unui α -helix stabil sunt: alanina, leucina, fenilalanina, tirozina, triptofanul, cisteina, metionina, histidina, asparagina, glutamina, valina.

Aminoacizii care pot destabiliza α -helixul sunt: serina, izoleucina, treonina, acidul glutamic, acidul aspartic, lizina, arginina, glicina.

Aminoacizii care pot provoca ruperea α -helixului sunt: prolina și hidroxi-prolina.

Studiul poliaminoacizilor, polipeptide în care toate moleculele de aminoacizi sunt identice, conduc la concluzii deosebite în sprijinul celor afirmate mai sus.

Astfel, polilizina la pH=7 nu formează un α -helix, ci o formă neregulată, întâmplătoare, deoarece la pH=7 grupele R ale polilizinei sunt încărcate pozitiv și se resping, împiedicând formarea legăturilor de hidrogen intralanțuri.

La pH=12 grupele R ale lizinei nu au încărcare electrică, deci nu se resping și se pot forma α -helixuri. În mod asemănător, acidul poliglutamic are o struc-

tură oarecare la $\text{pH}=7$, deoarece, toate grupele sale R sunt încărcate negativ, iar la $\text{pH}=2$ grupările R sunt protonate și se formează α -helixuri.

Formarea de α -helixuri este influențată și de ansamblul resturilor laterale ale lanțurilor polipeptidice. Poliizoleucina nu poate forma α -helixuri din cauza împiedicării sterice a grupelor sale R. La poliprolină, atomii de azot α fac parte din inele R rigide și, de aceea, nu este posibilă nici rotația legăturilor C-N din inel și nici a legăturilor C-N peptidice. De asemenea, în poliprolină nu se pot forma nici legături de hidrogen intralanț.

Structura terțiară este conformația proteinelor globulare care sunt constituite dintr-un singur lanț polipeptidic, spre deosebire de proteinele globulare constituite din două sau mai multe lanțuri polipeptidice a căror conformație este reprezentată printr-o structură cuaternară.

Structura terțiară a proteinelor globulare este mult mai complexă și mai puțin cercetată decât a proteinelor fibrilare a căror structuri sunt relativ simple.

Proteinele globulare au lanțuri polipeptidice înfășurate strâns în structuri tridimensionale compacte și au funcții biologice variate și bine definite.

O contribuție deosebită asupra structurii proteinelor globulare a adus-o cercetările cu raze X, cu toate că interpretarea rezultatelor este mult mai dificilă pentru proteinele globulare, în comparație cu cea a proteinelor fibrilare, deoarece lanțurile polipeptidice ale proteinelor globulare nu sunt așezate de-a lungul unei axe, ci sunt pliate, neregulat și compact, în forme aproape sferice.

În prezent, este cunoscută structura terțiară a multor proteine globulare printre care: mioglobina, a multor enzime ca: lizozimul, ribonucleaza, chimotripsina, carboxipeptidaza A, citocromul c, subtilizina etc.

Prima proteină globulară căreia i s-a studiat structura terțiară, pe baza unor analize cu raze X, a fost mioglobina din grăsimea de cașalot. (J.C. Kendrew și colab.).

Mioglobina este o proteină constituită dintr-un singur lanț polipeptidic ce conține 153 de aminoacizi. Molecula sa este foarte compactă și în interiorul ei rămâne un spațiu numai pentru patru molecule de apă. Aproape toate grupele R nepolare sau hidrofobe ale resturilor de aminoacizi se află în interiorul mole-

culei, iar grupele R, polare, se află localizate pe suprafața exterioară a moleculei și sunt hidratate.

Analiza cu raze X a altor proteine globulare, formate dintr-un singur lanț polipeptidic, arată că, fiecare proteină are un anumit mod de împachetare sau de structură terțiară. Toate proteinele globulare formate dintr-un singur lanț, pentru structura terțiară au aceleași trăsături menționate pentru mioglobina.

Lanțul polipeptidic al mioglobinei este peste 70% sub forma unor segmente α -elicooidale. Cele mai multe proteine globulare studiate au un conținut mult mai mic de structură α -elicooidală și unele conțin segmente de lanț cu conformația β .

Proteinele globulare native suferă o denaturare prin încălzire, la tratamentul cu acizi și baze, cu soluții concentrate de uree sau clorhidrat de guanidină, dând configurații desfășurate, întâmplătoare, ale lanțurilor lor polipeptidice. Cu toate că această modificare este însoțită de pierderea activității biologice, unele proteine denaturate își recapătă spontan activitatea biologică și conformația lor originală.

Experimentele cu privire la renaturarea proteinelor globulare au arătat că secvența aminoacizilor din lanțul polipeptidic determină structura terțiară a proteinelor globulare, care, de fapt, este o reflectare a diferitelor tipuri de restricții asupra libertății de rotație în jurul legăturilor simple din lanțurile polipeptidice.

Aceste restricții includ natura rigidă, planară a legăturilor peptidice, unghiurile permise ϕ și ψ ale legăturilor $\text{C}_\alpha\text{-C}$ și $\text{C}_\alpha\text{-N}$ dintre resturi succesive, numărul și localizarea resturilor hidrofobe din secvență, ca și numărul și localizarea grupărilor R încărcate pozitiv sau negativ.

Conformația lanțului polipeptidic rezultă din adaptarea fiecărei legături simple din scheletul polipeptidic la diferitele restricții învecinate sau mai îndepărtate, rezultând o singură conformație terțiară caracteristică, având activitate biologică specifică.

Structura terțiară nativă a proteinelor globulare este stabilizată de patru tipuri de legături slabe:

1. legături de hidrogen între grupele peptidice din α -helixuri sau din structura de foaie pliată a conformației β ;
2. legături de hidrogen între resturile laterale R ale aminoacizilor;
3. interacții hidrofobe între resturile laterale R nepolare ale aminoacizilor;
4. legături ionice între grupele încărcate pozitiv și cele încărcate negativ (grupele $-\text{COO}^-$ ale acizilor aspartic și glutamic și grupele $-\text{NH}_3^+$ ale lizinei).

Dintre aceste patru tipuri de legături, se pare că, interacțiunile hidrofobe dintre grupele R nepolare au o importanță mai mare. Cele mai multe proteine au 30–50% aminoacizi cu grupări R nepolare, care, în majoritate, se află în interiorul proteinelor globulare native, apărute de expunerea la apă.

Când grupele nepolare sunt puse în contact cu apa, se crează o nouă interfață (vezi volumul al IV-lea al tratatului), care impune ca moleculele de apă adiacente să realizeze un aranjament mai ordonat decât l-au avut în apa pură; astfel, este nevoie de un plus de energie pentru a introduce o grupare R nepolară în apă. Un lanț polipeptidic nepliat, cu grupele sale R nepolare expuse, va tinde să atingă o conformație în care grupele R nepolare să fie ferite de expunerea la apă.

Unele proteine globulare sunt oligomere și sunt constituite din două sau mai multe lanțuri polipeptidice (tabelul 10.3.).

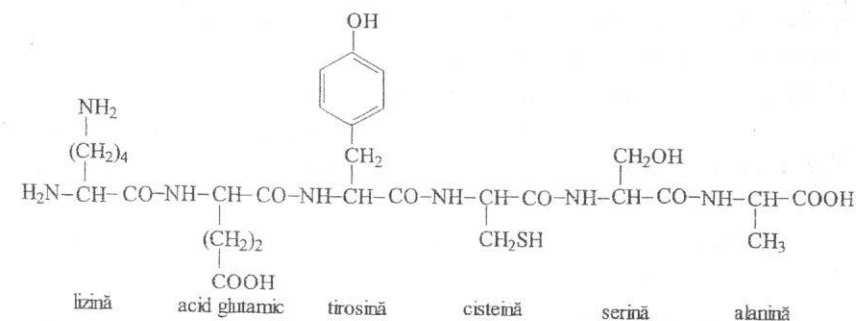
Tabelul 10.3.

Proteine globulare cu două sau mai multe lanțuri polipeptidice

Proteina	Numărul de lanțuri	Masa moleculară
Insulină (bovine)	2	5.700
β – Lactoglobulină	2	35.000
Hemoglobină (umană)	4	64.500
Hexokinază	2	102.000
Triptofan sintetază (E.coli)	4	159.000
Glutamat sintetază	12	592.000
Virusul mozaicului tutunului	2.130	40.000.000

Moleculele proteinelor sunt construite din catene polipeptidice lungi, în care resturile de α -aminoacizi sunt unite între ele prin legături amidice ($\text{CO}-\text{NH}$).

Catenele polipeptidice sunt constituite din unități $\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}$ legate cap la cap și se deosebesc numai prin catenele laterale, R :



Compoziția elementară a proteinelor este următoarea: 50–55% carbon, 7% hidrogen, 23–25% oxigen și 15–16% azot și 0,3–2,0% sulf. În unele cazuri, se mai găsesc: fosfor, fier, zinc, cupru, iod, brom sau clor.

Masa moleculară a proteinelor este cuprinsă între 5000 (limită inferioară luată arbitrar) și 1000000 și chiar mai mult (exemple: insulina de bovină, 5700; chimotripsinogenul din pancreasul bovin, 23200; hemoglobina umană, 64500; triptofan sintetaza de la E. coli, 159000; virusul mozaicului tutunului, 40000000).

Prin hidroliză acidă, proteinele sunt scindate până la α -aminoacizi, compuși organici simpli, cu masă moleculară mică. Multe proteine conțin două sau mai multe lanțuri polipeptidice, iar un lanț polipeptidic conține 100–300 aminoacizi și mai mult.

Organismul animal asimilează numai aminoacizi liberi, nu și peptide sau proteine. În timpul digestiei, enzimele proteolitice din sucurile tubului digestiv hidrolizează total proteinele în aminoacizi.

Enzimele proteolitice hidrolizează numai legăturile peptidice dintre α -aminoacizii din seria L. La hidroliză participă *proteinazele* (*pepsina*, *trip-*

sina, chimotripsina) care hidrolizează proteinele native până la peptide și peptidazele (carboxipeptidaze, aminopeptidaze, dipeptidaze), care hidrolizează peptidele până la aminoacizi. Gruparea în proteinaze și peptidaze este îndreptățită din punct de vedere fiziologic.

Cercetările întreprinse asupra specificității enzimelor proteolitice au dus la concluzia că toate sunt, de fapt, peptidaze și s-a propus împărțirea lor *endopeptidaze* (corespund proteinazelor), care rup legături peptidice centrale și dau naștere la peptide mai mici și *exopeptidaze* (corespund peptidazelor), care rup legăturile peptidice de la marginea catenei eliberând aminoacizii terminali.

Fiecare enzimă proteolitică hidrolizează preferențial anumite legături peptidice. Astfel, pepsina hidrolizează legătura peptidică în partea N terminală a fenilalaninei și tirozinei, tripsina rupe legătura peptidică în partea C terminală a lizinei și argininei, chimotripsina rupe legătura peptidică în partea C terminală a fenilalaninei și tirozinei. Carboxipeptidazele desprind câte un aminoacid din partea C terminală a lanțului polipeptidic și aminopeptidazele scindează câte un aminoacid din partea N terminală a lanțului polipeptidic.

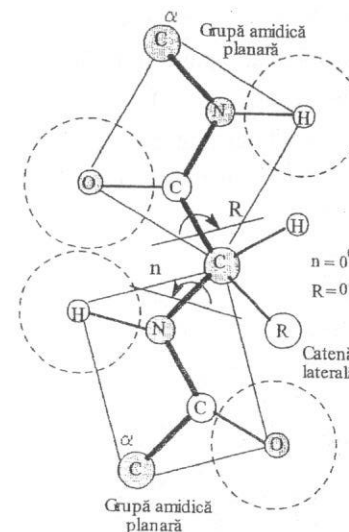
În afară de enzimele proteolitice din secrețiile tubului digestiv, se găsesc asemenea enzime și în țesuturile animalelor și plantelor. Se menționează catepsina care contribuie la autoliza post mortem a țesuturilor animale, papaina care a fost izolată din planta *Carica papaya* și ficina din smochin [2].

10.2. FUNDAMENTUL STRUCTURII PROTEINELOR

Proteinele constau din lanțuri polipeptidice și diferite grupe laterale. Succesiunea grupelor laterale este codată de acizii nucleici.

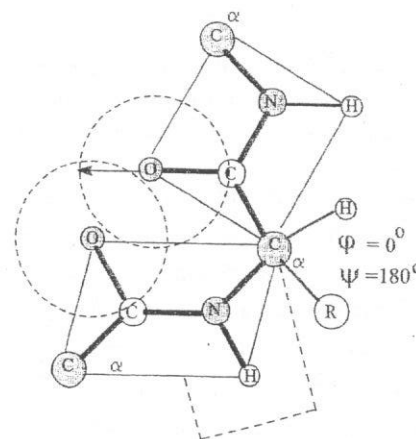
Într-un lanț polipeptidic care conține legături peptidice planare există numai două grade de libertate pentru aminoacizi: rotirea cu un unghi φ în jurul axei legăturii $C_\alpha-N$ și rotirea cu un unghi ψ în jurul axei legăturii $C_\alpha-C$.

Rotațiile φ și ψ sunt pozitive când ele merg în sensul acelor ceasornicului, văzute din C_α . O înserare a valorilor φ și ψ pentru toate resturile de aminoacizi conduce la configurația exactă a unui lanț. Când $\psi = 0^\circ$ și $\varphi = 0^\circ$ grupele peptidice sunt coplanare (Fig.10.4.).



La $n = \varphi^0$ și $R = \psi^0$ grupele peptidice sunt coplanare

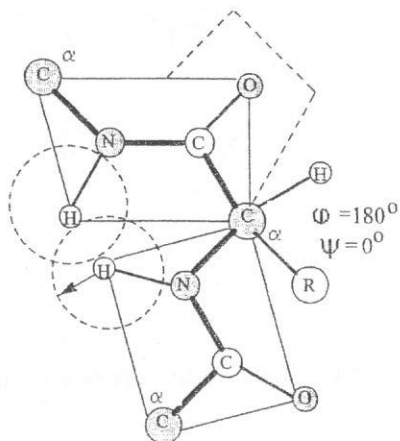
Fig. 10.4. Grupă amidică planară la care $\varphi = 0^\circ$ și $\psi = 0^\circ$



La $\varphi = 0^\circ$ și $\psi = 180^\circ$ raza de legătură nu unește împreună atomii de oxigen

Fig. 10.5. Aranjament nepermis când $\varphi = 0^\circ$ și $\psi = 180^\circ$

Unele valori pentru ϕ și ψ nu sunt permise, deoarece, în aceste cazuri, nu se pot realiza legături între atomii apropiați. În figurile 10.5. și 10.6. sunt exemple de aranjamente interzise, în care $\phi = 180^\circ$ și $\psi = 0^\circ$ sau $\phi = 0^\circ$ și $\psi = 180^\circ$, când atomii de oxigen ai carbonilului și atomii de hidrogen de la $-NH-$ sunt în situația de a nu putea forma legături de hidrogen.



La $\phi = 180^\circ$ și $\psi = 0^\circ$ raza de legătură nu unește împreună atomii de oxigen

Fig.10.6. Aranjament nepermis când $\phi = 180^\circ$ și $\psi = 0^\circ$

Dacă curbura lanțului polipeptidic la toți C_α este aceeași, atunci lanțul formează un helix. Un astfel de helix este format din spire distanțate între ele cu p nm pe lungimea axei lor; o spirală conține n resturi de aminoacizi, iar creșterea spiralei pentru fiecare rest de aminoacid este: $d = p / n$ nm.

Valoarea lui $p=nd$, care determină mersul în sus a helixului, poate fi precis determinată de îndată ce ϕ și ψ sunt cunoscuți. La un lanț polipeptidic cu dimensiunile definite, n și d sunt stabiliți îndată ce sunt determinați ϕ și ψ . Deci numărul de aminoacizi dintr-o spirală depinde de ϕ și ψ .

Așa după cum s-a mai arătat, unele structuri se vor putea ușor forma, iar altele sunt imposibil de format, pentru că atomii lor nu pot fi uniți prin legături

chimice, ei fiind prea aproape unii de alții [1].

Ramachandran și colaboratorii săi din Madras au cercetat toate conformațiile posibile cu ajutorul modelelor și a computerului.

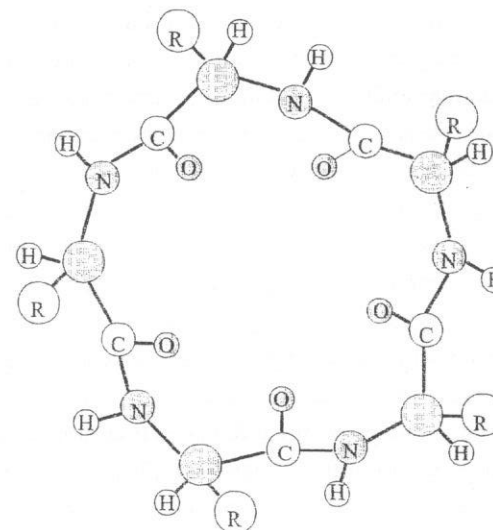


Fig. 10.7. Spirală din cinci resturi de aminoacizi la $\phi = 120^\circ$ și $\psi = 86^\circ$ este cu greu posibilă și depinde de oxigenii grupelor carbonil.

Domeniul de la 20° la 140° este îndeosebi favorizat [1].

Se produce o rotire a legăturii N-H către catena laterală și o mare posibilitate de depărtare a grupei carbonil a aceleiași peptide a lanțului lateral. La $\phi = 120^\circ$ și $\psi = 86^\circ$ [2] se formează lanțul cu spirale ce conțin cinci resturi de aminoacizi. În această structură atomii de oxigen ai grupelor carbonil sunt orientați în spre partea de mijloc, foarte apropiați unii de alții și structura ajunge la granița de instabilitate (Fig.10.7.).

Dacă ψ se mărește, se desfac spirele helixului, iar numărul resturilor de aminoacizi din spirală scade. Câteva din aceste structuri au, în special, legături transversale de hidrogen între spirele succesive. Helixul π are 4,4 resturi de

aminoacizi pe spiră, iar α -helixul, care este foarte important, are 3,6 resturi de aminoacizi pe spiră.

Creșterea lui ψ peste 86° face trecerea de la helixuri a căror spire au cinci resturi de aminoacizi la helixuri cu patru, trei și în sfârșit cu două resturi de aminoacizi pe spiră. Scăderea numărului de resturi de aminoacizi pe spiră duce la îngustarea diametrului helixului și în același timp la creșterea de-a lungul lungimii sale.

α -Helixul, cu 3,6 aminoacizi pe spiră, are o structură deosebit de stabilă și se găsește la un număr mare de proteine. Legăturile transversale de hidrogen ale α -helixului sunt slabe la grupa $-NH$ în comparație cu a π -helixului. Grupele carbonilice sunt paralele cu axa helixului și se leagă direct cu grupele $-NH$.

Helixurile 3_{10} -, α - și π - (Fig.10.8.) se diferențiază între ele prin legăturile lor de hidrogen, care la α -helix sunt liber tensionate și în consecință sunt stabile.

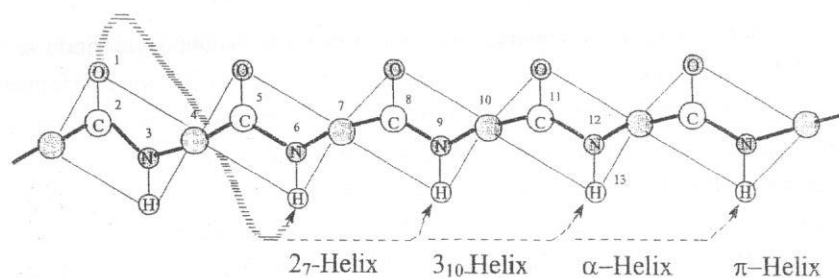


Fig.10.8. Diferite tipuri de helixuri

Dacă ψ crește peste 150° , se ajunge la un alt helix stabil, 3_{10} -helix, în care oxigenul carbonilului se află mai aproape de grupa $-NH$ și formează legături de hidrogen stabile, dar mai slabe decât în α -helix. Grupele carbonilice sunt îndepărtate de la axa helixului și legăturile transversale de hidrogen sunt din această cauză unghiulare. 3_{10} -Helix se găsește la un număr restrâns de proteine (de exemplu, hemoglobină, lizozimă).

La valori ale lui ψ mai mari de 180° se înaintază cu dificultate căci atomii de oxigen ai atomilor de carbon încep să se ciocnească cu atomii de hidrogen amidici din resturile de aminoacizi. Peste $\psi = 234^\circ$ se ajunge la un domeniu cu noi proprietăți și helixul se rotește la stânga. Aproape de $\psi=310^\circ$ sunt trei aminoacizi pe spiră și o structură care se găsește la poliprolină.

Această structură cu o înfășurare de la stânga la dreapta are o proprietate esențială: grupele carbonil și grupele amido sunt dispuse aproape perpendicular pe axa helixului și pot să formeze, într-o mai mare măsură, legături de hidrogen cu grupele aceleiași lanț.

În collagen se rotesc împreună trei helixuri tip „poliprolină” într-o răsucire de la dreapta la stânga, un helix în jurul altuia, la care una, două sau trei grupe carbonil și amido formează legături transversale de hidrogen între lanțuri.

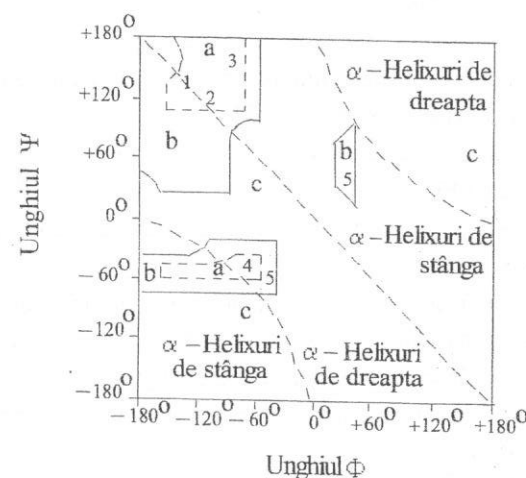


Fig.10.9. Reprezentarea după Ramachandran a unghiurilor Φ și Ψ .

Suprafețele a indică valoarea unghiurilor Φ și Ψ a conformației stabile permise. Suprafețele b reprezintă conformații mai puțin stabile. Suprafețele c corespund unghiurilor Φ și Ψ nepermise. 1. Structuri β din foi pliate antiparalele. 2. Structuri β paralele. 3. α -Helix de collagen. 4. α -Helix de dreapta. 5. Structuri β paralele.

Dacă ψ crește în continuare, crește numărul de resturi de aminoacizi pe spirală și helixul se apropie din nou de unul care conține un pentapeptid pe spirală. La $\psi = 350^\circ$ se ajunge la patru resturi de aminoacizi pe spirală, dar grupele sale carbonilice încep să se împiedice reciproc la axa helixului.

Domeniul de la $\psi = 20^\circ$ până la $\psi = 86^\circ$ este o zonă integral nepermisă și la $\psi = 86^\circ$ spiralele helixului au din nou cinci resturi de aminoacizi.

G.N. Ramachandran și colaboratorii au întocmit o diagramă a unghiurilor ϕ și ψ , permise și nepermise ale legăturilor $C_\alpha-C$ și $C_\alpha-N$ (Fig.10.9.). Numai conformațiile care cad în suprafețele a din figura 10.9. sunt stabile și permise.

10.3. STRUCTURA PROTEINELOR

Fiecare tip de moleculă proteică, în stare naturală, are o formă tridimensională specifică numită *conformație*.

Conformația se referă la aranjarea în spațiu a grupelor substituente, care, datorită rotației în jurul legăturii simple de carbon din moleculă, pot ocupa diferite poziții fără ca legătura să se rupă [3].

Lanțul polipeptidic al unei proteine are o singură conformație în condiții biologice normale de pH și temperatură; această conformație nativă este destul de stabilă, iar scheletul covalent al lanțului polipeptidic, format din legături simple, nu se poate roti liber.

În funcție de conformația lor, proteinele se pot grupa în două mari clase: *proteine fibrilare* formate din lanțuri polipeptidice paralele, aranjate de-a lungul unei singure axe, dând naștere la filamente lungi sau foi și *proteine globulare*, în care lanțurile polipeptidice sunt pliate compact în forme sferice sau globulare.

După Linderström-Lang, Bernal și alții, se disting patru grade structurale sau niveluri de organizare ale proteinelor: *structura primară*, *structura secundară*, *structura terțiară* și *structura cuaternară*.

Structura primară se referă la scheletul covalent al lanțului polipeptidic și la înlanțuirea aminoacizilor în catenele polipeptidice.

Structura secundară prezintă aranjamentul unui lanț polipeptidic într-o singură dimensiune în spațiu. Structura secundară este evidentă în special la proteinele fibrilare, unde lanțurile polipeptidice prezintă o pliere longitudinală sau extinsă, dar și la fragmente de lanțuri polipeptidice ale proteinelor globulare.

În anul 1951, Pauling și Corey au emis supoziția că modalitatea cea mai probabilă de îndoire sau răsucire a unui lanț polipeptidic este cea elicoidală, sub forma unei spire lungi, α -helix.

Din cauza configurației L a aminoacizilor pe care o compun, spirala sau α -helixul, cel mai frecvent, are sensul unui șurub de dreapta (rotire de la stânga la dreapta), iar resturile R ale aminoacizilor sunt direcționate către exterior. În acest model gruparea este planară din cauza rezonanței, iar resturile de aminoacizi sunt rotite unul față de altul, așa încât să fie posibile legăturile de hidrogen intramoleculare, unind grupele CO și NH din spiralele consecutive ale elicei. Aceste legături asigură soliditatea întregii construcții.

Structura terțiară se raportează la conformația moleculară, referindu-se la modul de înclinare sau de pliere a lanțurilor polipeptidice în spațiul tridimensional la proteinele fibrilare sau formarea structurii compacte a proteinelor globulare. Macromoleculele proteice sunt formate, de cele mai multe ori, din mai multe lanțuri polipeptidice, care se unesc între ele prin diferite tipuri de legături: covalente, electrovalente, de hidrogen, Van der Waals.

Experimente cu privire la renaturarea proteinelor globulare arată că secvența aminoacizilor determină structura terțiară a acestora, ceea ce este o reflectare a diferitelor tipuri de restricții asupra libertății de rotație în jurul legăturilor simple din lanțul polipeptidic.

Restricțiile sunt cele referitoare la natura rigidă, planară a legăturilor peptidice, unghiurile permise ϕ și ψ ale legăturilor $C_\alpha-N$ și $C_\alpha-C$ dintre resturile succesive, numărul și localizarea resturilor hidrofobe și hidrofile din secvență, ca și numărul și localizarea grupelor R încărcate pozitiv sau negativ.

Structura terțiară a proteinelor globulare este stabilizată prin legături de hidrogen între grupele peptidice ca în α -helix sau în structura de foaie pliată a conformației β ; legături de hidrogen între grupele R; interacții hidrofobe în-

tre grupele R nepolare; legături ionice între grupele încărcate pozitiv și cele încărcate negativ, cum sunt grupele $-\text{NH}_3^+$ ale lizinei sau $-\text{COO}^-$ ale acizilor aspartic și glutamic. Grupele R nepolare în proteinele globulare native, fiind apărate de expunerea la apă, nu vor contribui la destabilizarea proteinelor.

Unele proteine globulare, constituite din două sau mai multe lanțuri polipeptidice, sunt *oligomere*.

La proteinele globulare, modul caracteristic în care se așează lanțurile polipeptidice individuale, unele față de altele, formează structura *cuaternară*.

Când proteinele globulare oligomere sunt supuse la temperaturi mai mari decât cea fiziologică, sau sunt tratate cu soluții concentrate de uree sau de guanidină, se produce denaturarea lor prin disocierea lanțurilor polipeptidice, unele de altele și apoi deplierea lanțurilor individuale în spirale neregulate.

Unele proteine oligomere, chiar la o denaturare drastică, se pot renatura și își recăpătă funcțiile biologice.

Aceasta este o dovadă că secvențele de aminoacizi ale lanțurilor polipeptidice din proteinele oligomere, determină nu numai structura lor secundară și terțiară, ci și forma locurilor de contact, care face posibilă potrivirea cu exactitate a lanțurilor polipeptidice și asocierea lor strânsă în structura cuaternară respectivă.

Structura cuaternară se formează din mai multe structuri terțiare, care se unesc între ele, dând naștere la construcții mai complexe, numite structuri cuaternare. Forțele de atracție sunt aceleași ca și în structurile terțiare, mai puțin legăturile covalente, cu deosebirea că ele acționează, în acest caz, intermolecular.

Uneori, un grup de proteine care funcționează împreună se întâlnesc în celulă sub formă de *cluster*, un ansamblu sau un complex supramolecular.

10.3.1. DETERMINAREA SUCCESIUNII AMINOACIZILOR

Structura primară constă din numărul și succesiunea resturilor de aminoacizi din catena polipeptidică.

Pentru elucidarea succesiunii aminoacizilor structurii primare se procedează la desfacerea reproductibilă a lanțului polipeptidic în fragmente cât mai mari. Apoi, după despărțirea acestora, se scindează din nou, reproductibil, în părți mai mici, care, de asemenea, se izolează.

Se ajunge astfel la peptide de 2–20 aminoacizi care sunt accesibile determinării directe a secvenței aminoacizilor. Apoi, secvențele parțiale se îmbină din nou în secvențe totale.

Scindarea lanțului polipeptidic se poate face chimic sau enzimatic.

Înainte de scindare, lanțul este pregătit prin desfășurarea amplă a structurii spațiale, tratându-se cu o soluție de 8 M uree, când se rup eventualele punți disulfidice și în continuare, se blochează toate resturile de cisteină prin reducere cu mercaptoetanol sau ditioeritrit și apoi cu acid iodacetic sau acrilonitril pentru carboximetilarea tuturor grupelor SH.

Scindarea enzimatică se realizează cu enzime proteolitice, dar cele mai multe au o specificitate redusă pentru scindarea legăturii peptidice din dreptul unui anumit aminoacid.

Deosebit de selectivă este tripsina care catalizează hidroliza legăturilor peptidice de la arginină și lizină. În cazul lanțurilor foarte lungi este de dorit să se hidrolizeze mai întâi cât mai puține legături peptidice. Fragmentele mari sunt separate unul de altul, înainte de a fi descompuse mai departe pentru determinarea secvențelor parțiale.

Acest lucru ușurează mai târziu combinarea în secvența totală. În acest scop, lanțurile laterale de lizină sunt blocate reversibil cu trifluoracetil. Prin aceasta, secvența este scindată doar la arginină. După separarea acestor peptide-arginină-COOH se desprinde gruparea de protecție și peptidul este tratat apoi cu tripsină, obținându-se peptide-lizină-COOH.

Mai puțin specifică este chimotripsina care hidrolizează legăturile peptidice în partea C-terminală de la tirozină, fenilalanină, metionină, dar și de la leucină, izoleucină, histidină și alți aminoacizi. Se obține astfel un amestec de peptide care nu este complet reproductibil, la fel ca și la utilizarea pepsinei sau papainei.

Scindarea cu tripsină și chimotripsină are loc la pH = 7,5 și respectiv 9,0, iar

menținerea constantă a pH-ului pe parcursul procesului se realizează prin neutralizarea treptată a grupelor carboxilice eliberate de la lizină și arginină prin titrare cu o soluție de hidroxid de sodiu. În funcție de cantitatea de hidroxid de sodiu consumată, se stabilește cantitatea de lizină și arginină pe care o posedă proteina și astfel se controlează descompunerea.

Pentru enzimele care acționează în mediu acid se folosește reacția cu ninhidrină în vederea determinării grupelor aminice eliberate.

Scindarea chimică poate servi la determinarea secvenței aminoacizilor din peptide și proteine. Sanger și Thompson (1953) au determinat secvența aminoacizilor în lanțurile A și B ale insulinei, prima proteină a cărei structură covalentă a fost cunoscută.

În vederea determinării secvenței aminoacizilor din peptide sau proteine se parcurg următoarele etape :

- Proteinele care conțin mai multe lanțuri polipeptidice acestea se separă și se purifică.
- Grupările disulfidice pe care le conțin se reduc la grupări sulfhidrilice și se alchilează.
- Fiecare lanț polipeptidic se hidrolizează total și se determină compoziția în aminoacizi.
- Se identifică resturile N- și C-terminale.
- Un lanț polipeptidic este scindat în peptide mai mici prin hidroliză chimică sau enzimatică.
- Fragmentele de lanț se separă între ele și se determină compoziția și secvența aminoacizilor pentru fiecare.
- Un lanț polipeptidic nativ este scindat în fragmente printr-un alt procedeu decât primul, pentru a se produce fragmentarea în alte puncte, apoi fragmentele rezultate se separă și se determină compoziția și secvența aminoacizilor.
- Se cercetează secvențele aminoacizilor din cele două serii, pentru a se realiza punerea cap la cap a fragmentelor în vederea stabilirii secvenței aminoacizilor lanțului polipeptidic studiat.

– Se determină poziția punților disulfidice și a grupărilor aminice.

a) La proteinele care conțin mai multe lanțuri polipeptidice, acestea se separă și se purifică. Numărul de lanțuri este dedus din numărul de resturi de aminoacizi N-terminali din molecula de proteină.

Pentru identificarea restului de aminoacid N-terminal sunt mai multe posibilități.

Cea mai mult folosită este metoda lui Edman, în care fenilizotiocianatul reacționează cantitativ cu grupa aminică liberă a peptidei formând feniltiocarbamoilpeptidul corespunzător.

La tratare cu acid restul de aminoacid N-terminal este scindat ca feniltiocarbamoil-aminoacid, iar restul lanțului peptidic rămâne neschimbat (Fig.10.10.). Feniltiocarbamoil-aminoacidul este ciclizat la derivatul feniltiohidantoinic care poate fi separat și identificat prin cromatografia în gaz-lichid.

Faptul că restul lanțului peptidic, după îndepărtarea aminoacidului N-terminal rămâne intact, face ca metoda Edman să poată fi folosită pentru identificarea secvențială a celorlalți aminoacizi ai peptidei.

Prima metodă de determinare a resturilor de aminoacizi N-terminali a fost propusă de F. Sanger (1953), care a constatat că grupările libere α -aminice neprotonate ale peptidelor reacționează cu 2, 4-dinitrofluor-benzenul (DNFB) formând derivați 2,4-dinitrofenil galbeni. Dacă acești derivați ai peptidei sunt supuși hidrolizei cu HCl 6N, toate legăturile peptidice sunt hidrolizate.

Face excepție legătura dintre gruparea 2,4-dinitrofenil și grupa α -aminică a aminoacidului N-terminal, care este relativ stabilă la hidroliza acidă (Fig.10.11.) [3].

Derivatul 2,4-dinitrofenil-aminoacid N-terminal poate fi ușor separat de restul de aminoacizi rezultați la hidroliza acidă și poate fi identificat prin comparare cu cromatogramele unor derivați dinitrofenil cunoscuți, ai diferiților aminoacizi.

Metoda Sanger a fost înlocuită cu procedee mai sensibile ca acel în care se folosește clorura de dansil (1-dimetilaminonaftalin-5-sulfonil).

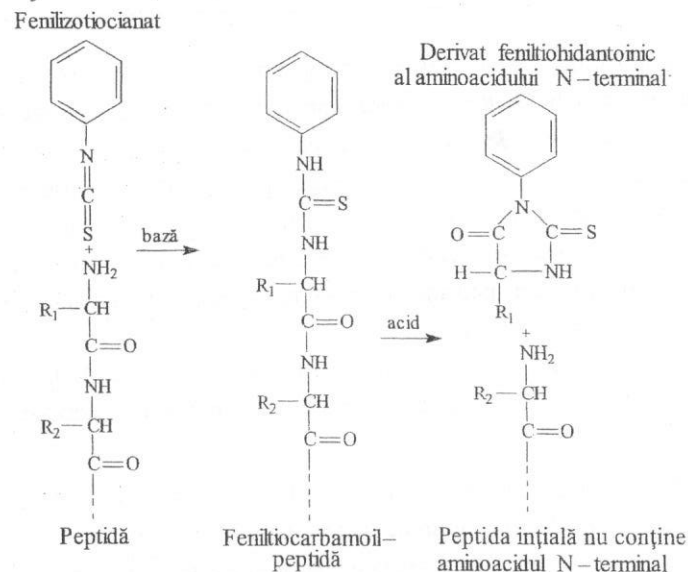


Fig.10.10. Identificarea aminoacidului N-terminal prin metoda Edman [3].

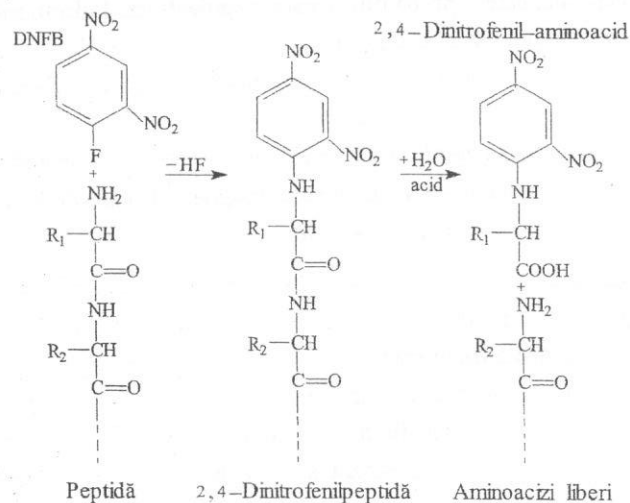
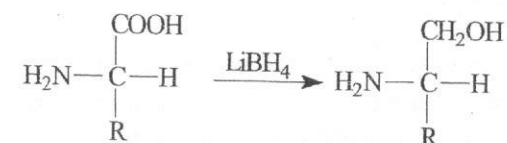


Fig.10.11. Identificarea aminoacidului N-terminal prin metoda Sanger.

Aminoacidul C-terminal al peptidelor poate fi identificat prin reducerea sa cu un agent puternic reducător, borohidru de litiu (LiBH_4), în mediu anhidru, cu formarea alcoolului primar corespunzător :

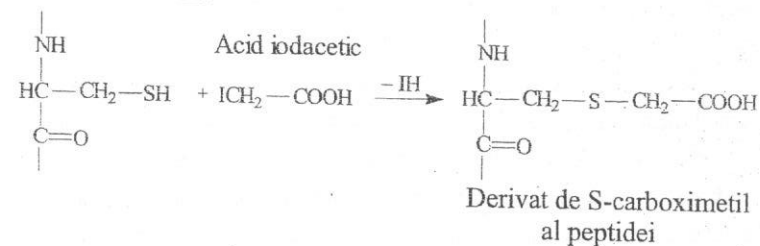


Dacă peptida este complet hidrolizată, hidrolizatul rezultat conține o moleculă de α -aminoalcool corespunzător aminoacidului C-terminal, care poate fi identificat pe cale cromatografică.

Un alt procedeu de identificare a aminoacidului C-terminal este *hidrazinoliza*, prin care toate legăturile peptidice sunt desfăcute, iar aminoacizii, cu excepția aminoacidului C-terminal, reacționează cu hidrazina, formând hidrazide. Aminoacidul C-terminal este apoi identificat cromatografic.

b) În cazul proteinelor care conțin mai multe lanțuri polipeptidice și acestea sunt legate transversal, prin una sau mai multe punți disulfidice, obișnuit, aceste punți pot fi desfăcute prin reducerea lor la grupări sulfhidril în prezența unui exces de mercaptoetanol. Grupările sulfhidril se alchilează cu agenți de alchilare, ca de exemplu acid iodacetic și se formează derivați S-carboximetil :

Peptidă cu rest de cisteină



Alți agenți de alchilare folosiți sunt: iodacetamida și etilenimina. Alchilarea resturilor de cisteină trebuie făcută deoarece grupele sulfhidril sunt instabile și au tendința de a se oxida.

c) Lanțul polipeptidic separat și purificat, fără punți disulfidice sau grupări sulfhidrilice libere, se supune hidrolizei totale și se determină compoziția în aminoacizi. Legăturile peptidice sunt hidrolizate la cald cu o soluție acidă sau bazică.

Prin fierbere la 100–120°C, cu un exces de soluție de acid clorhidric 6 N, într-un vas închis, legăturile peptidice din polipeptide sunt în totalitate hidrolizate. Pe această cale triptofanul este complet distrus, iar serina și treonina într-o măsură mai mică.

De asemenea, grupările amidice ale asparaginei și glutaminei sunt hidrolizate obținându-se acid aspartic și acid glutamic.

La hidroliza acidă, racemizarea aminoacizilor se produce într-o mică măsură sau de loc.

Hidroliza alcalină a polipeptidelor, prin fierbere cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu, determină distrugerea cisteinei, serinei și treoninei și racemizarea tuturor aminoacizilor.

Triptofanul este stabil la hidroliza alcalină.

Compoziția în aminoacizi a hidrolizatelor se determină pe cale cromatografică.

d) Următoarea etapă la determinarea secvenței aminoacizilor este fragmentarea lanțului polipeptidic în peptide mici, care pot fi separate și identificate. Aceasta se realizează printr-o hidroliză parțială sau selectivă a lanțului polipeptidic.

Se poate folosi hidroliza parțială cu un acid diluat, deoarece legăturile peptidice dintre unele perechi de aminoacizi sunt mai sensibile la hidroliza acidă.

Pentru desfacerea lanțului polipeptidic în fracțiuni specifice de lanț s-au elaborat o serie de metode chimice, din care se menționează reacția polipeptidului cu bromcianul (BrCN), care desface legăturile peptidice la care participă gruparea carboxilică de la metionină, iar metionina este convertită într-un rest de *homoserin-lactonă* C-terminală.

Numărul de fragmente rezultate din polipeptidă este egal cu numărul de resturi de metionină din lanț.

Pentru fragmentarea lanțurilor polipeptidice se folosesc frecvent *proteazele*, enzime care hidrolizează legătura peptidică. În acest scop s-au utilizat: *tripsina*, *chimotripsina*, *pepsina*, *termolizina*.

Dintre aceste enzime, cea mai mare specificitate o are tripsina care scindează lanțul polipeptidic la capătul C-terminal al lizinei sau argininei, urmează apoi chimotripsina care scindează la capătul C-terminal al fenilalaninei, triptofanului sau tirozinei, pepsina scindează la capătul C-terminal al fenilalaninei, triptofanului, tirozinei și alții.

Termolizina, o protează bacteriană termostabilă, poate hidroliza legăturile peptidice în care funcția amino provine de la aminoacizi nepolari ca leucina, izoleucina, valina.

e) Pentru studiul secvenței aminoacizilor este necesară separarea peptidelor (a fragmentelor de lanț) obținute, pentru care se folosesc două tehnici: cromatografia pe hârtie sau electroforeza pe hârtie și cromatografia pe coloană.

f) După separarea fragmentelor peptidice rezultate la hidroliza parțială a lanțului polipeptidic, câte o probă din fiecare fragment este hidrolizată complet și se determină compoziția în aminoacizi.

Pe alte probe, se determină apoi secvența aminoacizilor fiecărui fragment peptidic prin degradarea secvențială după metoda Edman.

Dacă fragmentul peptidic este prea lung, se identifică resturile de aminoacizi N- și C-terminale, se segmentează fragmentul peptidic și se determină din peptidele mici secvența aminoacizilor.

g) Un lanț polipeptidic nativ este scindat în fragmente prin două procedee diferite, pentru a se produce fragmentarea, la fiecare procedeu, în alte puncte. De exemplu, se face o fragmentare cu bromcian și alta cu tripsină.

Cunoscându-se locurile de scindare în cazul celor două fragmentări se pot ordona fragmentele peptidice din lanțul polipeptidic.

Fragmentele rezultate se separă și se determină compoziția și secvența aminoacizilor.

h) Se determină poziția punților disulfidice și a grupărilor aminice ale lanțului polipeptidic studiat.

10.4. FUNCȚIILE BIOLOGICE ALE PROTEINELOR

După funcția lor biologică, proteinele se pot grupa în: *enzime* (biocatalizatori), *proteine cu rol de protecție din sângele vertebratelor*, *proteine de rezervă*, *hormoni*, *toxine*, *proteine de transport*, *proteine contractile*, *proteine structurale*.

Enzimele, circa 2000 de tipuri diferite, fiecare catalizând un anumit tip de reacție chimică, având o specificitate mai mare sau mai mică, sunt proteine globulare (vezi capitolul 11).

Trombina, *fibrinogenul*, *anticorpii*, sunt proteine cu rol de protecție din sângele vertebratelor. Trombina și fibrinogenul participă la coagularea sângelui prevenind pierderile de sânge din sistemul vascular. Anticorpii sau globulinele imune se combină cu proteinele străine sau alte substanțe care au pătruns în sângele sau țesuturile vertebratelor, inactivându-le.

Proteinele de rezervă (*ovalbumina*, *cazeina*, *gliadina*, *zeina* etc.), au funcția de depozitare a aminoacizilor pentru a servi ca substanțe nutritive sau ca unități de construcție a embrionului în creștere.

Hormonii au diferite funcții biologice specifice. Astfel, *insulina* secretată de celule specializate ale pancreasului reglează metabolismul glucozei; *hormonul de creștere* sau *somatotropina* secretat de hipofiza anterioară are ca funcție principală stimularea sintezei de proteine în toate țesuturile, determinând creșterea greutatea corporală; *corticotropina* (*adenocorticotropina*) reglează funcția cortexului suprarenalelor etc.

Toxinele sunt substanțe deosebit de toxice pentru animalele superioare. Dintre acestea se menționează: *ricinul* din semințele de ricin, *gossipina* din semințele de bumbac, *toxina* din *Clostridium botulinum* care produce intoxicații bacteriene alimentare, *toxina de difterie* o toxină bacteriană etc.

Proteinele de transport (*hemoglobina*, *hemocianina*, *mioglobina*, *albumina serică*, β_1 -*lipoproteina*, *globulina fixatoare de fier*, *ceruloplasmina*) leagă și transportă anumite molecule pe calea sângelui.

Hemoglobina din eritrocitele vertebratelor transportă oxigenul de la plămâni la țesuturi. Hemocianinele transportă oxigenul în cazul nevertebratelor.

Albumina serică leagă și transportă acizii grași între țesutul adipos și alte țesuturi sau organe ale vertebratelor. Lipoproteinele din plasma sanguină transportă lipidele între intestin, ficat și unele țesuturi. Ceruloplasmina transportă cuprul în sânge.

Proteinele contractile (*miozina*, *actina*, *dineina*) au rol în sistemele de contracție și mișcare. Actina și miozina au roluri însemnate în sistemul de contracție a mușchilor scheletici la vertebrate, iar dineina în mișcarea cililor și flagelilor.

Proteinele structurale (*proteine din învelișurile virale*, *colagenul*, α -*keratina*, *elastina*, *reticulina*, *mucoproteine*, *glicoproteine*, *fibroina*, *sclerotina*) au roluri însemnate în structura organismelor.

Colagenul, proteină extracelulară, este predominant în țesutul conjunctiv și osos, de asemenea, fibrilele de colagen participă la legarea împreună a unui grup de celule, la formarea unui țesut.

Keratinele provin din celulele ectodermului și sunt prezente în epiderm ca și în derivații biologici ai ectodermului, cum sunt: părul, lâna, solzii, penele, unghiile, copitele, coarnele.

Elastina și reticulina se găsesc în țesutul elastic. Cartilajele, ligamentele, tendoanele conțin alături de proteinele fibroase și mucoproteine care au printre altele rol de lubrifiant. Proteinele din învelișurile virale se găsesc în teaca din jurul acizilor nucleici.

Sclerotina formează exoscheletul insectelor. Fibroina este în constituția firului de mătase și a firelor de păianjen (proteinele fibroase sunt tratate în volumul al III-lea al acestui tratat).

10.5. DENATURAREA PROTEINELOR

Denaturarea proteinelor este o modificare a stării native, tridimensionale, a lanțurilor polipeptidice ale moleculei proteice, ducând la o structură mai puțin ordonată.

Denaturarea implică energii care produc doar modificarea structurii secundare și terțiare, iar structura primară rămâne intactă. Acest efect are loc la tratarea proteinelor cu agenți liotropi în concentrații mari (uree, guanidină,

CaCl₂ etc.), la încălzirea la temperaturi peste 60–70° C în soluții apoase, la modificarea pH-ului fiziologic înspre PH=3 sau pH=9 și mai mult, iradierea cu raze ultraviolete sau raze Röntgen, tratarea cu tensioactivi și cu unii dizolvanți organici (alcool etilic, acetona etc.).

Forma nativă a proteinelor este cea mai săracă în energie. În timpul denaturării se schimbă ordonarea strictă a lanțurilor polipeptidice și a celor laterale.

Dintre toate însușirile fizice ale proteinelor native, aceea care suferă modificarea cea mai ușor de observat este solubilitatea.

Cele mai multe molecule proteice își păstrează activitatea biologică numai pe intervale de temperatură și pH limitate, apropiate de temperatura și pH-ul fiziologic. De exemplu, prin denaturare enzimele își pierd activitatea lor catalitică.

Denaturarea înseamnă desfacerea structurii normale specifice moleculelor proteice native fără ruperea legăturilor covalente peptidice din lanțurile polipeptidice și nici a altor legături covalente, cu excepția unor legături disulfidice. Studiul energetic duce la concluzia că denaturarea este cauzată de ruperea unui număr mai mare sau mai mic de legături slabe cum sunt: legăturile ionice, legăturile de hidrogen și forțele van der Waals. Totodată, se produce o schimbare importantă în conformația moleculei.

Dacă modificările conformaționale nu sunt prea adânci și temperatura și pH-ul revin la valoarea fiziologică, molecula proteică depliată revine la forma nativă, biologic activă, prin reformarea legăturilor dintre lanțurile polipeptidice, are loc procesul de *renaturare* sau de *reconstituire*.

Secvența de aminoacizi din lanțurile polipeptidice conține informația necesară specificității conformației native pliate și această conformație nativă (forma tridimensională caracteristică) determină activitatea biologică a proteinei.

10.6. STABILITATEA ȘI FUNCȚIILE PROTEINELOR

Procesele vitale sunt dependente de prezența proteinelor care au rol de catalizatori, de molecule structurale, transport molecular etc. Pentru îndeplinirea funcțiilor lor în activitatea biologică, trebuie ca lanțurile polipeptidice, din care sunt alcătuite, să fie corect împăturate în structura tridimensională a stării natu-

rale. În succesiunea de împăturire spontană a proteinelor în stare nativă trebuie să scadă în energie Gibbs față de starea desfășurată. Față de această constatare, Anfinsen a considerat că stările native și desfășurate sunt în echilibru, iar starea nativă este, în general, la minimum de energie Gibbs, care se realizează fără ruperea legăturilor covalente.

Deoarece starea nativă și desfășurată sunt în echilibru, reacția de împăturire poate fi cuantificată în termeni ai termodinamicii.

Contribuția diferitelor interacțiuni la mărimile termodinamice poate fi explorată în sensul cunoașterii cum contribuie ele la stabilitatea proteinei. Echilibrul dintre starea nativă (N) și desfășurată (D) este definit prin constanta de echilibru K:

$$K = \frac{[D]}{[N]}$$

Diferența de energie liberă între stările desfășurată și nativă este:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

unde R este constanta universală a gazelor și T este temperatura absolută în °K.

Energia liberă este compusă din contribuțiile entalpică și entropică:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

în care ΔH^0 este schimbul entalpic și ΔS^0 schimbul entropic în desfășurare.

Interacțiunile considerate a domina stabilitatea proteinelor sunt: efectul hidrofobic, legătura de hidrogen și aspectul entropic.

Efectul hidrofobic, în general, se referă la slaba solubilitate a compușilor hidrofobi în apă (de exemplu, compuși apolari).

Legătura de hidrogen intramoleculară, la proteine, concurează cu legăturile de hidrogen ale moleculelor de apă. Este competiția care determină contribuția legăturii de hidrogen la stabilitatea proteinei.

Într-o proteină desfășurată, lanțul polipeptidic poate lua diferite poziții rotametrice în jurul unghiurilor torsionale ϕ și ψ iar o parte a lanțurilor pot adopta diferite unghiuri rotametrice în jurul χ . La starea nativă, aproape toate

unghiurile ϕ și ψ au restricții pentru o singură poziție, așa cum este în majoritate unghiul χ .

Acestă pierdere a gradului de libertate se transpune în pierderea entropiei configuraționale.

Stabilitatea proteinei este afectată de factori ai mediului înconjurător ca: temperatura, pH-ul și prezența sărurilor.

Temperatura afectează stabilitatea modificând aportul efectului hidrofobic, a legăturilor de hidrogen și a entropiei configuraționale.

Stabilizarea proteinelor în prezența osmoliților. Este important de cunoscut mecanismele folosite de plante, animale și microorganisme pentru adaptarea la condițiile mediului înconjurător din biosferă, care pot denatura proteinele și degrada procesele celulare. Mediul înconjurător defavorabil duce la sollicitări extreme care produc denaturarea.

Dintre acestea se menționează: temperatura, deshidratarea celulară, uscare, concentrația mare în săruri, pH-ul, ca și prezența în celulă a unor concentrații mai mari de uree.

Unele plante, animale, microorganisme s-au adaptat mediului înconjurător extrem acumulând concentrații însemnate de molecule organice mici, numite *osmoliți*, care protejează componenții celulari împotriva denaturării.

Astfel, dizaharidul trehaloza este principalul osmolit care protejează împotriva uscării.

Nu toate moleculele organice mici, acumulate intracelular, au rol de protecție împotriva denaturării elementelor celulare. Astfel, ureea se poate acumula în celulele renale de la mamifere producând efecte de denaturare asupra proteinelor intracelulare.

Osmoliții cu acțiune protectoare sunt unii polioli ca: glicerolul, zaharoza, trehaloza și alte zaharuri; unii aminoacizi, printre care: prolina și glicina; anumite metilamine ca sarcosina, N-oxid trimetilamina și betaina etc.

Polioli protejează organismele împotriva temperaturii, deshidratării sau uscării; aminoacizii protejează celulele împotriva mediului înconjurător cu concentrații mari în săruri.

Legătura termodinamică între structură, stabilitate și funcție la proteine.

Multe proteine suferă schimbări conformaționale în timpul activității lor sau flexibilitatea lor conformațională devine critică în activitatea biologică.

În multe cazuri conformația proteinelor se schimbă când un ligand este fixat.

Capacitatea schimbului de căldură observată la proteina destabilizată este în mare măsură rezultatul schimbului în hidratarea grupelor reactive, care sunt ferite de solvent în stare nativă și ajung expuse la solvent, la destabilizare.

În cursul desfășurării funcțiilor lor biologice, proteinele interacționează cu alte macromolecule.

Ca rezultat al acestor interacțiuni, proprietățile proteinelor pot fi modificate în diferite feluri. Interacțiunea cu alte molecule poate modifica proteina de la o stare funcțională la alta, prin stabilizarea selectivă a unor structuri.

Stabilitatea conformațională este definită prin schimbul de energie liberă la reacția de destabilizare, $F \leftrightarrow U$, în condițiile de mediu (în general, în jurul temperaturii camerei și la pH neutru):

$$\Delta G = G_U - G_F$$

Aceasta poate fi evaluată folosind relația:

$$\Delta G_U = -RT \ln K_U$$

unde K_U este constanta de echilibru la reacția de destabilizare.

10.7. PROTEINE MAI IMPORTANTE

Într-o clasificare dată anterior, proteinele s-au împărțit în solubile în apă și insolubile sau scleroproteine. O a treia clasă este aceea a proteidelor (proteine conjugate), care sunt combinații între o proteină și o componentă neproteică, așa numita grupă prostetică; acestea sunt mai apropiate, prin proprietățile lor, de proteinele solubile.

Proteine simple (holoproteine). Acestea sunt proteine ale căror molecule sunt formate numai din catene polipeptidice. Acest lucru a fost demonstrat prin faptul că la hidroliză completă, holoproteinele pun în libertate numai aminoacizi. Din această grupă fac parte o serie de proteine ce îndeplinesc funcții

importante biochimice și fiziologice: α , β și γ -globulinele serice, anticorpii, histonele, protaminele, fibrinogenul, miozina, actina, collagenul, fibroina, keratinele etc.

Proteinele complexe (conjugate, sau *heteroproteine*) conțin în molecula lor, pe lângă componenta proteică și o componentă neproteică numită *grupare prostetică*. La rândul lor, heteroproteinele se împart în mai multe grupe în funcție de natura chimică a grupărilor prostetice.

Cromoproteinele conțin în molecula lor o grupare *protoporfirinică*. Din această categorie fac parte o serie de proteine ce îndeplinesc funcții importante biochimice și fiziologice: *hemoglobina*, *mioglobina*, *citocromii*, *catalaza*, *peroxidaza* etc.

Lipoproteinele conțin în molecula lor grupări prostetice de natură lipidică. Din aceasta grupă fac parte de exemplu lipoproteinele serice.

Fosfoproteinele. Grupările prostetice din această grupă sunt reprezentate de resturi de serină esterificate cu acid fosforic. Cele mai cunoscute fosfoproteine sunt: *cazeina*, *vitelina*, *vitelenina*, *fosvitina*.

Glicoproteinele conțin grupări prostetice de natură glucidică (galactoză, manoză, unele hexozamine, acidul N-acetilneuraminic etc.). Din grupa glicoproteinelor se menționează γ -globulinele, *orosomucoidul plasmatic*, *ovalbumina*, *glucoproteinele serice* ce determină grupele sanguine.

Metaloproteinele conțin unii ioni metalici (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) în calitate de grupare prostetică. Din aceasta grupă fac parte de exemplu: *alcooldehidrogenaza*, *enolaza*, *feritina*, *conalbumina*, *ceruloplasmina* și altele. Trebuie menționat faptul că, la metaloproteine, ionul metalic este legat direct de catenele polipeptidice ale componentei proteice și nu este inclus într-o altă structură (cum ar fi nucleul protoporfirinic la cromoproteine).

Flavoproteinele conțin un flavinnucleotid în calitate de grupare prostetică.

Din aceasta grupă fac parte *flavoenzimele FMN-* și *FAD-dependente* (*succinat-dehidrogenaza*, *aminoacid-oxidazele* etc.).

Nucleoproteinele au ca grupare prostetică un acid nucleic. În funcție de natura acidului nucleic ele se împart în *ribonucleoproteine* și *deoxiribonucleoproteine*.

10.7.1. PROTEINE SOLUBILE

Albumine și globuline animale

Sunt mult răspândite în natură și apar adesea împreună.

Albuminele sunt proteine solubile în apă și în soluții diluate de acizi, baze sau săruri, iar globulinele sunt proteine solubile numai în soluții de electroliți. Din aceste două clase de proteine fac parte proteinele din sânge, proteinele din mușchi, proteinele din ou și din lapte.

Sângele este o suspensie a unor corpuscule mari, vizibile la microscop: *globulele roșii*, *globulele albe* într-un lichid numit *plasmă*. Globulele roșii conțin toată proteina colorată în roșu, *hemoglobina*. Plasma conține, în soluție, *fibrinogenul*, *albumina* și *globulinele*. Lichidul rămas după îndepărtarea globulinelor și fibrinogenului se numește *ser sanguin* (vezi capitolul 2.4.7.)

Albumina plasmatică (*serum albumina*), reprezintă 55–60% din totalul proteinelor plasmatică, deci este cea mai abundentă proteină a serului. Are masa moleculară de 65000–69000 și este formată dintr-un singur lanț polipeptidic ce conține mai mult de 580 aminoacizi.

Este sintetizată de ficat și posedă o grupă tiol liberă ce permite formarea de complexe cu metale ca: Hg, Zn, Ag, Cu.

Serum albumina (albumina serică) are rolul de a menține constantă presiunea osmotică a serului, de asemenea, are rol de transportor al medicamentelor, al acizilor grași, pigmentilor biliari, vitaminelor, hormonilor, ionilor, etc.

Globulinele din serul sanguin sunt insolubile în apă pură, au masa moleculară medie de 150000 și punctul izoelectric în zona neutră a pH-ului.

Globulinele sunt solubile în soluții saline diluate, precum și în soluții acide sau bazice diluate. Globulinele se pot precipita cu o soluție concentrată de sulfat de amoniu.

Globulinele se găsesc în plasmă (α -, β - și γ -globuline), în țesutul muscular (*miozina*), în ou (*ovoglobulina*). γ -Globulinele au rol de anticorpi.

În albușul de ou, principalele proteine sunt: o albumină (*ovoalbumina*), o globulină și două proteide: *conalbumina* (flavoproteină) și *ovomucoida* (mucoidă).

Albumina din ou este un amestec de mai multe substanțe proteice.

Astfel, *vitelinele*, asemănătoare caseinelor, sunt fosfoproteide și au aceleași funcții fiziologice ca și a caseinelor, de a furniza aminoacizi și fosforul necesar dezvoltării embrionului sau animalului tânăr.

În lapte, alături de caseină, care reprezintă 78% în laptele de vacă, se găsesc albumine și globuline (17% în laptele de vacă) dintre care α -lactalbumina și β -lactoglobulina, care se pot obține din zerul rezultat după precipitarea cazeinei din lapte.

Structura terțiară nativă a proteinelor globulare este stabilizată de patru tipuri de legături slabe:

1. legături de hidrogen între grupele peptidice din α -helixuri sau din structura de foaie pliată a conformației β ;
2. legături de hidrogen între resturile laterale R ale aminoacizilor;
3. interacții hidrofobe între resturile laterale R nepolare ale aminoacizilor;
4. legături ionice între grupele încărcate pozitiv și cele încărcate negativ (grupele $-\text{COO}^-$ ale acizilor aspartic și glutamic și grupele $-\text{NH}_3^+$ ale lizinei).

Dintre aceste patru tipuri de legături, se pare că interacțiunile hidrofobe dintre grupele R nepolare au o importanță mai mare.

Cele mai multe proteine au 30–50% aminoacizi cu grupări R nepolare, care, în majoritate se află în interiorul proteinelor globulare native, apărate de expunerea la apă.

Când grupele nepolare sunt puse în contact cu apa, se crează o nouă interfață, care impune ca moleculele de apă adiacente să realizeze un aranjament mai ordonat decât l-au avut în apa pură; astfel, este nevoie de un plus de energie pentru a introduce o grupare R nepolară în apă.

Un lanț polipeptidic nepliat, cu grupele sale R nepolare expuse, va tinde să atingă o conformație în care grupele R nepolare să fie ferite de expunerea la apă.

Unele proteine globulare sunt oligomere și sunt constituite din două sau mai multe lanțuri polipeptidice (tabelul 10.4.).

Structura cuaternară a proteinelor globulare oligomere indică modul carac-

teristic în care lanțurile polipeptidice individuale, pliate se așază unele față de altele.

Tabelul 10.4.

Proteine globulare cu două sau mai multe lanțuri polipeptidice

Proteina	Numărul de lanțuri	Masa moleculară
Insulină (bovine)	2	5.700
β – Lactoglobulină	2	35.000
Hemoglobină (umană)	4	64.500
Hexokinază	2	102.000
Triptofan sintetază (E.coli)	4	159.000
Glutamat sintetază	12	592.000
Virusul mozaicului tutunului	2.130	40.000.000

Când proteinele cu două sau mai multe lanțuri polipeptidice sunt supuse unor agenți ca: aciditate crescută, căldură sau concentrații mari ale ureei sau guanidinei, care produc denaturarea lor, ele suferă modificări conformaționale trecând în forme mai puțin organizate, în două etape:

1. disocierea lanțurilor, unele de altele;
2. deplierea lanțurilor individuale în spirale neregulate.

Dacă tratamentul se face moderat și treptat, lanțurile polipeptidice ale proteinei globulare oligomere pot fi separate între ele fără a li se modifica structura terțiară normală.

Unele proteine globulare oligomere sunt capabile, ca după denaturare, să se replieze spontan în forma lor nativă. De exemplu, acidifierea aldolazei (enzimă care se găsește în plante și animalele superioare, are o masă moleculară de 160000 și conține patru subunități) produce separarea și deplierea celor patru subunități ale sale. Când pH-ul crește la aproximativ 7,0, subunitățile sale se repliază spontan în structura terțiară nativă și apoi se reasociază pentru a forma enzima oligomeră catalitic activă.

Aceste date arată că secvențele de aminoacizi ale lanțurilor polipeptidice din proteinele oligomere determină nu numai structura lor secundară și terțiară,

ci și geometria locurilor de contact, care face posibilă potrivirea exactă a subunităților polipeptidice și asocierea lor strânsă în structura cuaternară respectivă.

Toate proteinele, inclusiv cele care au o intensă activitate biologică sau efecte toxice sau care servesc ca elemente structurale etc., sunt formate din aceiași 20 de aminoacizi, care ei înșiși nu au deloc sau au o foarte slabă activitate biologică și nu au acțiune toxică. Conformația lor în structura tridimensională conferă fiecărui tip de proteină o activitate biologică specifică. Conformația este determinată, la rândul ei, de secvența specifică de aminoacizi din lanțurile polipeptidice.

În funcție de structura lor chimică, de rolul pe care îl îndeplinesc în organismele vii și de proprietățile lor fizico-chimice, proteinele pot fi clasificate în mai multe moduri.

Delimitarea netă între proteine și peptide este foarte dificilă deoarece există proteine alcătuite numai din catene polipeptidice (așa-zisele *proteine simple* sau *holoproteine*).

Majoritatea autorilor delimitează polipeptidele de peptide după masa lor moleculară, considerând că polipeptidele au o masă moleculară de până la 10000 Da, iar proteinele au masa moleculară superioară acestei valori.

În funcție de forma moleculelor, proteinele așa cum s-a mai arătat, sunt de două tipuri: *proteine fibroase* sau *fibrilare* și *proteine globulare*.

Proteinele sunt principalele componente organice ale organismelor vii, având funcții deosebit de importante în arhitectura celulei, în reglarea metabolică a activității vitale, în procesele implicate și în mecanismele imunologice. Nu există funcție fiziologică mai importantă în care să nu fie implicate una sau mai multe specii proteice.

În funcție de rolul biologic principal pe care îl îndeplinesc, proteinele globulare se împart în următoarele clase (Tabelul 10.5.).

În mușchii vertebratelor, alături de proteinele cu funcție structurală, se găsesc proteine solubile, unele cu funcție contractilă, altele cu funcție enzimatică. Proteinele solubile pot fi extrase cu soluții saline. Din mușchii vertebratelor au fost izolate: *miogenul*, *miosina*, *globulina X*, *stroma musculară*, *tropomiosina* și *actina*.

Tabelul.10.5.

Proteine grupate după funcția lor biologică.

Tipuri de proteine și exemple

Enzime proteolitice*Enzime proteolitice din sânge:*

Trombina, Plasmina, Kalicreina, Carboxipeptidaza N, Factorul de permeabilitate.

Enzime proteolitice de vegetale:

Papaina, Chimotripsina, Ficina, Bromelaina

Enzime proteolitice microbiene și fungice:

Proteaze neutre, Proteaze acide, Proteaze alcaline.

Enzime proteolitice ale vertebratelor:

Pepsina, Gastricsina, Renina, Enzime Proteolitice tisulare, Aminopeptidaze, Rennina, Dipeptidaze, Enzime proteolitice ale pancreasului, alte peptidhidrolaze.

Proteine de transportHemoglobina, Hemocianina, Mioglobina, Albumina serică, Ceruloplasmina, β_1 - Lipoproteina vertebratelor.**Proteine de rezervă**

Ovalbumina, Cazeina, Feritina, Gliadina, Glutenina, Zeina.

Proteine cu rol de protecție în sânge

Anticorpi, Fibrinogen, Trombina.

Hormoni

Insulina, Hormon adrenocorticotrop, Hormon de creștere

Toxine

Toxina din Clostridium botulinum, Toxina difteriei, Veninul de șarpe, Ricinul, Gossipina.

Proteine cu rol în sistemele de contracție și mișcare

(în care se găsesc structuri mixte fibroase și globulare)

Actina, Miozina, dineinele, Kinezinele.

Unele proteine au funcție de transport. Ele sunt capabile să lege și să transporte, pe calea sângelui, anumite tipuri de molecule.

Hemoglobina din eritrocitele vertebratelor transportă oxigenul de la plămâni la țesuturi. *Hemocianinele* au același rol la nevertebrate. *Mioglobina* este un transportator a oxigenului în țesutul muscular și stochează oxigenul în mușchi.

Albumina serică leagă acizii grași și îi transportă între țesutul adipos și alte țesuturi sau organe la vertebrate. β_1 -*Lipoproteina* din plasma sanguină transportă lipidele între intestin, ficat și țesuturile adipoase.

Ceruloplasmina este o α -2-globulină și are funcții de transport al cuprului seric, de oxidare a Fe^{2+} la Fe^{3+} , care permite transportul fierului de către transferrină, oxidarea catecolaminelor și a serotoninei, acțiune antioxidantă a lipidelor din membrana celulară, acțiune inflamatorie prin inhibarea histaminazei serice.

Unele proteine au roluri esențiale în sistemele de contracție și de mișcare. *Actina* și *Miozina* sunt proteine importante ale sistemului de contracție a mușchilor scheletici la care se adaugă *Dineinele* și *Kinesinele* proteine „motor” citoscheletale, respectiv „motoare” a microtubulilor care intervin în motilitatea cililor.

Este cunoscut faptul că multe proteine cu structură globulară sunt *enzime*.

Se cunosc peste 2000 de tipuri de enzime diferite, fiecare catalizând un anumit tip de reacție chimică.

Numeroase alte enzime catalizează o mare varietate de reacții. Ele au o mare specificitate în ceea ce privește funcția pe care o îndeplinesc.

Enzima numită *Hexokinaza* catalizează transferul unei grupări fosfat din acidul adenozintrifosforic (ATP) la glucoză, prima etapă a metabolismului glucozidic. Enzime ca *Citocromul c* transferă electronii la oxigenul molecular în timpul respirației, iar ADN-plimeraza și enzimele activatoare de aminoacizi participă la biosinteza compo-nenților celulari etc.

Toate enzimele sunt proteine globulare.

O altă clasă de proteine este cea a *proteinelor de rezervă* cu funcție de depozitare a aminoacizilor, pentru a servi ca substanțe nutritive sau ca unități de creștere a embrionului: *ovalbumina* din albușul de ou, *cazeina* din lapte, *gliadina* din boabele de grâu, *zeina* din boabele de porumb, *feritina* care concu-

ră la acumularea fierului în splină și altele.

Proteine cu rol de protecție. Acestea sunt proteine implicate în diferite procese fiziologice de protecție și apărare a organismului față de anumiți factori externi.

Cel mai mult studiate sunt *trombina*, o proteină ce participă la procesul coagulării sanguine, *fibrinogenul*, precursorul *fibrinei*, proteină implicată, de asemenea, în procesul coagulării sanguine, *imunoglobulinele* sau *anticorpii*, proteine capabile să formeze complecși *anticorp-antigen* cu proteinele străine organismului respectiv și altele.

Hormonii sunt substanțe chimice elaborate de celule specializate și pe cale sanguină ajung la organele sensibile unde efectuează acțiuni reglatoare asupra proceselor metabolice. Celulele specializate pentru elaborarea unui hormon sunt, în general, în unități anatomice distincte, glandele endocrine. Altelele celulele secretoare sunt răspândite printre celule cu alte funcții.

Hormonii pancreatici, *hipofizari*, *paratiroidieni* sunt de natură peptidică; numărul de resturi de aminoacizi variind de la câteva (*hormonii neurohipofizari* sunt nonapeptide), zeci sau sute (insulina are 51 resturi de aminoacizi, hormonul de creștere, 191). *Hormonii tiroidieni* și cei secretați de medulo-suprarenală sunt derivați ai unor aminoacizi. *Hormonii sexuali* și cei elaborați de cortexul suprarenalei sunt substanțe steroidice.

Toxinele sunt substanțe toxice, chiar și în cantități foarte mici.

Toxinele pot fi molecule mici, peptide sau proteine, care sunt capabile de a cauza îmbolnăvirea în contact sau cu absorbția țesuturilor organismului și interacționarea cu macromoleculele biologice asemenea enzimelor sau receptorilor celulari.

Multe familii de bacterii secretă biotoxine. Dintre toxinele care afectează omul sunt cele produse de bacteriile anaerobe ale genului *Clostridium*, foarte comună fiind *Clostridium botulinum*, care provoacă disenteria, tetanosul și difteria.

Se menționează, de asemenea, *ricinul* din semințele de ricin, *veninul de șarpe*, *micitoxinele* produse de unele ciuperci.

Proteinele intracelulare ale celulelor mușchiului scheletic se împart în două categorii: proteinele solubile în apă ale *sarcoplasmei* (lichidul intracelular al mușchiului, care conține glicogen, enzime glicolitice și intermediarii lanțului glicolitic, ATP, ADP, AMP, fosfat, fosfocreatină, creatină, electroliți anorganici, aminoacizi și peptide și care înconjoară miofibrilele), care reprezintă 20 – 25% din proteina totală musculară și proteinele filamentoase insolubile în apă ale miofibrilelor.

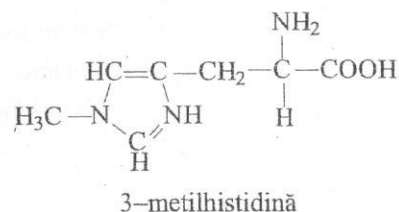
Proteinele solubile sarcoplasmatice se pot ușor extrage din mușchi cu apă rece; această fracțiune este numită *miogen*.

Miogenul conține enzime glicolitice ca: gliceraldehid-fosfatdehidrogenaza, glicerolfosfat dehidrogenaza, aldolaza, fosforilaza.

Actina se prezintă în două forme: actina G (actina globulară) și actina F (actina fibroasă), un polimer al actinei G. Actina G, o proteină globulară cu masa moleculară de 46000, este stabilă în apă distilată, fiecare moleculă leagă un ion de Ca^{2+} , de asemenea, o moleculă de ATP sau ADP.

Legarea ATP-ului de către actina G duce la polimerizarea acesteia cu formare de actină F.

Actina G, ca și miosina conține un rest de 3-metilhistidină, un aminoacid puțin obișnuit:



Două lanțuri de actină F, fiecare compus din monomeri de actină G sunt răsucite, unul cu altul, la alcătuirea filamentelor subțiri. Filamentele subțiri conțin, de asemenea, două proteine suplimentare: *tropomiosina* și *troponina*.

Tropomiosina reprezintă aproximativ 11% din proteina contractilă totală a mușchiului. Ea este constituită din două tipuri de lanțuri diferite polipeptidice α -helicoidale care se răsucesc împreună și are o masă moleculară de circa 70000. Moleculele de tropomiozină se asociază cap la cap și formează fibrile

care se dispun sub formă de rețea.

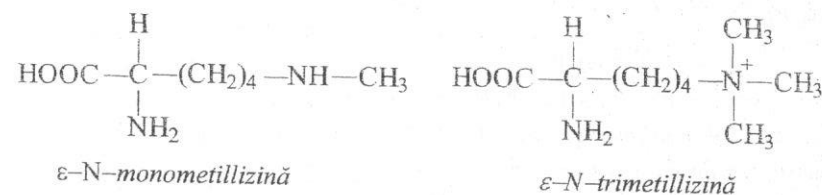
Troponina este o proteină globulară formată din trei lanțuri polipeptidice. Fiecare moleculă de troponină este atașată de filamentul subțire prin două situații de legare, unul specific pentru lanțul de actină și cel de al doilea pentru lanțul de tropomiozină.

În mușchiul scheletic există două componente proteice majore filamentoase, insolubile în apă, miozina (componenta majoră a filamentelor groase) și actina (componenta majoră a filamentelor subțiri).

Acestea, formează până la 80% din proteinele aparatului contractil. În plus, există cel puțin șase alte componente proteice: *tropomiosina*, *troponina*, *proteina liniei M*, *actinina α* și *actinina β* .

Miozina este o moleculă lungă (circa 160 nm), asimetrică, formată din două lanțuri polipeptidice lungi, identice de aproximativ 200000 daltoni, fiecare având circa 1800 aminoacizi, cu un cap globular și o masă moleculară de 460000.

Miozina conține trei aminoacizi neobișnuiți: 3-metilhistidină, ϵ -N-monometilizină și ϵ -N-trimetilizină.



Miozina leagă actina în două locuri specifice pentru a forma *actomiozina*, care are un rol însemnat în mecanismul contractil al mușchiului.

În afara claselor de proteine menționate, se găsesc în natură unele proteine cu funcții speciale.

Astfel de exemplu este proteina „antifreeze”, o clasă de polipeptide ce se găsește în sângele unor pești, în unele plante, fungi și bacterii cărora le permite să supraviețuiască în medii cu temperatură sub 0°C în Antarctica.

Monellina este o proteină cu gust foarte dulce, prezentă în anumite fructe din Africa de Vest, care în ultimul timp s-a identificat în mai multe părți ale lu-

mii și poartă diferite denumiri: *Thaumatococin*, *Pentadin*, *Mabinlin*, *Braztein*.

Proteine vegetale

Globulinele vegetale sunt răspândite în natură alături de albumine. Soluțiile lor sunt puțin vâscoase și coagulează mai greu decât globulinele animale. Se menționează globulinele din semințele oleaginoase (*excelsina* din nuca braziliană, *amandina* din migdale, *corilina* din alune), globulinele din leguminoase (*faseolina* din fasole, *legumina* din mazăre) și globuline din cartofi, tomate, spanac etc. [2].

Proteina din grâu, *glutenul*, este, de fapt, un amestec de două proteine; *glutenina* și *gliadina*.

Gliadina este singura proteină care se solvă în alcool de concentrație de 70% și pe această cale se poate separa de glutenină. Gliadina are un conținut ridicat de acid glutamic (40%). Grupele carboxilice ale resturilor laterale ale acidului glutamic sunt amidificate, și de aceea gliadina nu este o proteină acidă ca glutenina [2].

Glutenina este solubilă în soluții foarte diluate de hidroxizi alcalini și apoi poate fi precipitată din soluție prin acidulare. Glutenina este un aliment aproape complet. Unele cereale, cum este porumbul nu conține glutenină, iar gliadina sa, numită *zeină*, nu conține lizină, este săracă în triptofan, iar porumbul nu conține nici vitamina antipelagrosă (Niacina, Factor PP, nicotinamida).

Orezul nu conține gliadină și este un aliment mai valoros decât porumbul.

Proteine fiziologic active

Unele proteine din organismele vii intervin în procesele fiziologice esențiale, așa cum sunt: *enzimele*, *hormonii*, *toxinele*.

Enzimele sunt, fără excepție, proteine, au rolul de catalizatori organici și în această lucrare sunt tratate în capitolul 11 al acestui volum.

Hormonii sunt produși de secreție internă a unor celule specializate (glande sau țesuturi) și ajung pe cale sanguină, în concentrații foarte mici, la organele sensibile de acțiunea lor, unde exercită reglarea unor procese metabolice. Unii hormoni sunt molecule mici neproteice, astfel hormonii sexuali și cei elaborați de cortexul suprarenalei sunt substanțe steroide.

Hormonii pancreatici, hipofizari, paratiroidieni sunt de natură peptidică,

compuși dintr-un număr relativ mic de aminoacizi. Hormonii neurohipofizari sunt nonapeptide, insulina are 51 de resturi de aminoacizi, hormonul de creștere 191. Hormonii tiroidieni și cei secretați de medulosuprarenală sunt derivați ai unor aminoacizi [7].

Toxine. O serie de substanțe extrem de toxice pentru animalele superioare chiar în cantități foarte mici, de natură proteică, includ *ricinul* din semințele de ricin, *gossipina* din semințele de bumbac, *toxina difteriei*, *toxina bacteriei aërobe Clostridium botulinum*, *veninurile șerpilor*, *albinelor*, *viespile*.

Proteine bazice din nucleotide

Protaminele și *histonele* se găsesc legate de acizii nucleici.

Protaminele au greutate moleculară mică și cantități mari de arginină și lizină, ceea ce le face să fie puternic bazice.

Astfel protamina din somon, *salmina*, are greutatea moleculară de 8000 și conține 40 resturi de arginină, 7 de serină, 4 de prolină, 3 de glicocol, 2 de valină și câte unul de izoleucină și alanină.

Histonele sunt proteine relativ mici, foarte bazice, la pH=7,0 sunt încărcate pozitiv și au o masă moleculară de 10000–20000.

Există cinci clase de histone, diferențiate pe baza numărului relativ de lizină și arginină (tabelul 10.6.) [3].

Tabelul 10.6.

Histonele aparținând celor cinci clase

Clasa	aminoacidul cel mai frecvent, %		Masa moleculară
H ₁	Lys	27	21000
H ₂ A	Lys	16	13000
H ₂ B	Lys	11	15000
	Arg	9	
H ₃	Arg	15	15342
	Lys	10	
H ₄	Arg	14	11000
	Gly	15	

Unele grupări hidroxil ale serinei aflate în componența histonelor sunt fosforilate enzimatic de către protein kinază. Sarcinele pozitive ale histonelor, determină asocierea electrostatică a acestora cu grupările fosfat ale ADN, încărcate negativ, ceea ce conferă o mai mare flexibilitate moleculei de ADN.

10.7.1.1. PROTEINE DE TRANSPORT

Există două tipuri diferite de proteine de transport: acelea care transportă molecule la locații îndepărtate (în celulă sau organism) și acelea care servesc la transportarea moleculelor prin diferite membrane biologice.

Organismele multicelulare dispun de un sistem avansat de distribuție a oxigenului în toate celulele.

Hemoglobina. Numele de hemoglobină rezultă din două cuvinte: *hem* și *globină* și se simbolizează cu "Hgb" sau "Hb".

Hemoglobina este o proteină cu structură cuaternară a cărei funcție principală este transportul oxigenului în organismul uman și a altor vertebrate. Hemoglobina se găsește în globulele roșii ale sângelui (140–180 g/l hemoglobină la bărbați și 120–160 g/l hemoglobină la femei), cărora le conferă culoarea roșie (vezi capitolul 2.4.7. din volumul I al tratatului).

Hemoglobina umană este constituită din patru lanțuri polipeptidice, dintre care două lanțuri α , identice cu câte 141 aminoacizi fiecare, și două lanțuri β , identice cu câte 146 aminoacizi fiecare, ceea ce reprezintă un total de 574 aminoacizi pentru molecula de hemoglobină (Fig.10.12. și Fig.10.13.).

α Capăt N-terminal Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-Lys-Val-Gly-Ala-His-Ala-Gly-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Leu-Ser-Phe-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Gln-Val-Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg Capăt C-terminal.

β Capăt N-terminal Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Trp-Gly-Lys-Val-Asn-Val-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe-Phe-Glu-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Thr-Pro-Asp-Ala-Val-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Phe-Ser-Asp-Gly-Leu- α - β -Asp-Ala-His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Thr-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys-Val-Leu-Ala-His-His-Phe-Gly-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Pro-Val-Gln-Ala-Ala-Tyr-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His Capăt C-terminal.

Fig.10.12. Secvența de aminoacizi a catenelor α și β ale hemoglobinei.

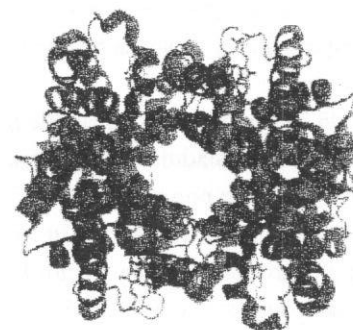


Fig. 10.13.

Model a structurii tridimensionale a hemoglobinei

Fiecare din aceste patru lanțuri polipeptidice au câte o grupă prostetică, un hem (Fig.10.14. și Fig.10.15.). O moleculă de hem este constituită dintr-un ion de fier (Fe^{2+}) complexat cu o porfirină.

Lanțurile polipeptidice sunt cuprinse de jur împrejur de grupele hem, ceea ce face ca afinitatea între fier și oxigen să fie destul de puternică, pentru ca hemoglobina să lege oxigenul în plămâni, dar legătura rezultată este suficient de slabă pentru ca hemoglobina să poată elibera oxigenul când ajunge în patul capilar din țesuturi. De asemenea, hemoglobina are funcția de a accepta dioksi-

dul de carbon de la țesuturile periferice, contribuind la transportul său către plămâni.

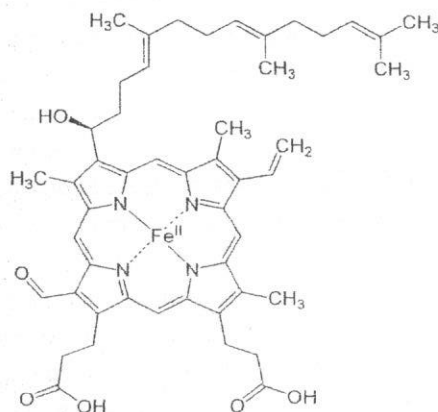


Fig.10.14. Structura Hemului a

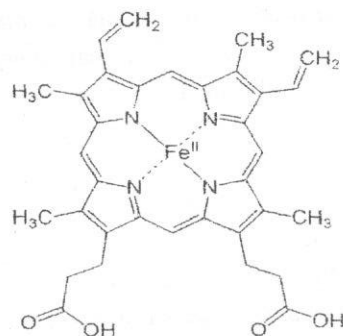


Fig.10.15. Structura Hemului b

Molecula de hemoglobină este foarte compactă; în interiorul ei rămâne un spațiu pentru patru molecule de apă. Toate grupele R polare ale resturilor de aminoacizi sunt hidratate și se găsesc la suprafața exterioară ale moleculei. Aproape toate grupele R nepolare sau hidrofobe se află în interiorul moleculei, ferite de expunerea la apă. Resturile de prolină se găsesc numai în zonele de

curbură, care conțin și aminoacizi ce nu sunt favorabili formării de spirale α -elicooidale, despre care s-a amintit mai sus.

Hemoglobina leagă oxigenul, prin intermediul fierului (Fe^{2+}) din hem, formând *oxihemoglobina* care dă sângelui culoarea roșie.

Hemoglobina formează cu agenții oxidanți (nitriți, nitrați), cu unele droguri, *methemoglobina* care dă sângelui o culoare roșie, mult mai deschisă, decât în cazul *oxihemoglobinei*.

Conformația hemoglobinei este aceea care determină felul în care funcționează. Când o moleculă de oxigen se leagă cu unul din cei patru atomi de fier, întreaga moleculă își schimbă forma, înlesnindu-le celorlalți trei atomi de fier formarea de legături cu alte molecule de oxigen (vezi capitolul 2.4.7.).

Atracția hemoglobinei pentru oxigen variază în funcție de concentrația locală în oxigen. Când concentrația este mare, hemoglobina leagă oxigenul; iar când nivelul concentrației este scăzut hemoglobina cedează oxigenul. Aceasta dă posibilitatea sângelui de a se satura cu oxigen când trece prin plămâni și să elibereze oxigen în țesuturile organismului acolo unde este nevoie de el.

În forma tetramerică a hemoglobinei normale, legătura cu oxigenul la formarea *oxihemoglobinei* este afectată de saturarea cu oxigen a moleculei, care se reflectă în curba de afinitate a oxigenului pentru hemoglobină (curbă în formă de S).

În graficul din Fig.10.16. abscisa arată variația presiunii parțiale a oxigenului iar ordonata prezintă procentajul moleculelor de hemoglobină care sunt saturate cu oxigen.

Afinitatea hemoglobinei față de oxigen descrește în prezența dioxidului de carbon, la pH scăzut și când temperatura crește. Aceste proprietăți sunt esențiale pentru viață, deoarece permit o mai bună eliberare a oxigenului în țesuturile active (de exemplu, mușchiul în exercițiu, la producerea de metaboliți, dezvoltă un pH acid, temperatura sa crește realizându-se disocierea oxigenului din hem).

Dioxidul de carbon reacționează cu apa pentru a forma dicarbonat:



Această reacție arată că sângele posedând o cantitate de dioxid de carbon ridicată are un pH mai coborât.

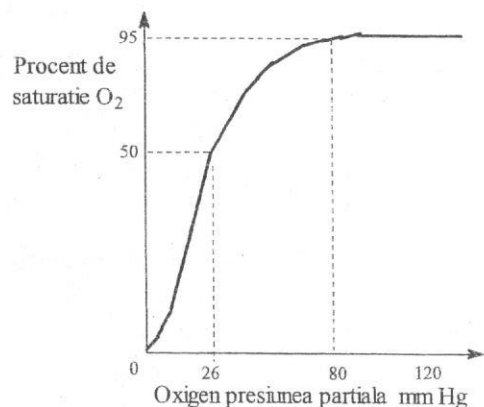


Fig. 10.16. Capacitatea hemoglobinei de a fixa oxigenul în funcție de presiunea parțială a oxigenului

Hemoglobina poate să se lege cu protonii și cu dioxidul de carbon, ceea ce induce o schimbare a conformației proteinei care ușurează eliberarea oxigenului. Protonul poate să se lege în diferite locuri de-a lungul proteinei, iar dioxidul de carbon se leagă cu grupa α -aminică formând *carbamat*.

Când nivelul dioxidului de carbon din sânge se micșorează, de exemplu, aproape de plămâni, crește afinitatea proteinei pentru oxigen. Legătura oxigenului este, de asemenea, influențată de prezența 2,3-difosfogliceratului, care diminuează afinitatea hemoglobinei pentru oxigen.

La persoanele aclimatizate la altitudini mari, creșterea concentrației în 2,3-difosfoglicerat în sânge permite hemoglobinei de a elibera cantități mai importante de oxigen la țesuturi în atmosfere sărace în oxigen.

Monoxidul de carbon formează cu hemoglobina *carboxihemoglobina*, un compus stabil. Afinitatea hemoglobinei pentru monoxidul de carbon este superioară celei a oxigenului, ceea ce poate provoca o hipoxie tisulară. Inhalarea sa în doze mari provoacă indispoziții, cefalei, după aceea astenie și în final moartea prin asfixie. Se tratează otrăvirile severe cu oxid de carbon prin imersii prelungite în atmosferă de oxigen la presiune mai ridicată.

Agentele oxidante precum nitrații, conținuți în apă sau în legume pot oxida fierul fieros (Fe^{2+}) al hemului la fier fieric (Fe^{3+}), care este incapabil de a fixa

oxigenul, se formează *methemoglobina*.

La vertebratele terestre, datorită circulației sanguine, hemoglobina fixează dioxidul din aerul care se găsește în plămâni și îl transportă la țesuturi pentru a lăsa să fie consumat de celulele care au nevoie.

Hemoglobina se găsește în centrul unui ciclu eterogen porfiric (nucleu tetrapirolic), hemul, care conține un ion de fier. Acest ion de fier este locul de fixare a oxigenului. Ionul fieros formează șase legături de coordinație, din care patru cu azotul și două cu acizii aminici ai lanțurilor polipeptidice (cu histidina).

Fierul poate exista sub două forme în moleculă: sub formă fieroasă, ionul Fe^{2+} fiind singura formă activă a hemoglobinei, se formează oxihemoglobina (interacțiune reversibilă cu oxigenul) și sub formă fierică, ionul Fe^{3+} , când se produce methemoglobina, o interacțiune ireversibilă cu oxigenul.

Cantitatea normală de methemoglobină, în condițiile unui subiect sănătos este de 1–2%, fiind menținută la acest nivel în special de acțiunea *methemoglobinreductazei*.

Methemoglobinemia poate fi congenitală, cel mai adesea datorită deficitului de enzimă *citocrom b5 reductază*. Dar majoritatea methemoglobinomiilor se datoresc ingestiei de produse oxidante, care cel mai adesea sunt nitrații și nitriții conținuți în alimente și în unele produse farmaceutice.

La om, hemoglobina este un tetramer constituit din două lanțuri polipeptidice α similare și două β , de asemenea, similare, între care, sunt legături slabe. Masa moleculară a lanțurilor α și β este de aproximativ 17000 Da pentru fiecare. Fiecare lanț polipeptidic are un hem, astfel că o moleculă de hemoglobină are capacitatea totală de a lega patru molecule de oxigen.

Eliminarea hemoglobinei. În situații patologice globulele roșii sunt fagocitate de macrofagii splinei și ai ficatului. Fiziologic, ele sunt eliminate mai degrabă de măduva osoasă. În cursul acestui proces, partea proteică a hemoglobinei este degradată sub formă de aminoacizi, care sunt reciclați. Hemul este degradat la *biliverdină*, apoi la *bilirubină* (porfirină fără fier) de culoare galbenă.

Hemoglobina este o hemoproteină care asigură funcția fundamentală a eritrocitului de transport de gaze (O_2 și CO_2) între plămâni și țesuturi. Ea repre-

zintă cam o treime din masa eritrocitară. La om, cantitatea totală de hemoglobină, la un organism cu o greutate medie de 70 kg și la un volum sanguin de 5 l, este de circa 800 g.

Hemoglobina asigură transportul oxigenului în sânge, participă la transportul dioxidului de carbon de la țesuturi la plămâni, contribuie la menținerea echilibrului acido-bazic și a concentrației ionilor de hidrogen în spațiul extracelular.

Cele patru lanțuri polipeptidice ale hemoglobinei sunt astfel aranjate încât interacțiunile dintre lanțurile asemănătoare sunt slabe și între cele diferite sunt mai puternice.

La deoxigenare, în structura hemoglobinei se produc schimbări care constau din apropierea celor două lanțuri α de hem la distanța de 1 Å, iar cele două lanțuri β se depărtează de hem la o distanță de 6,5 Å.

La oxigenarea hemoglobinei procesul are loc invers.

Lanțurile α și β ale hemoglobinei au câte opt zone elicoidale despărțite de șapte segmente neelicoidale. Ca la toate proteinele globulare, la hemoglobină, în zonele pliate sunt prezenți aminoacizii dezorganizatori, prolina și hidroxi-prolina și aminoacizii destabilizatori: serina, izoleucina, treonina, acidul glutamic, acidul aspartic. Aproape toate resturile laterale polare ale aminoacizilor sunt dirijate în spre exteriorul moleculei de hemoglobină, iar către cavitatea interioară a moleculei, doar cele nepolare.

În hemul hemoglobinei, atomul de fier (Fe^{2+}) este situat în centrul unui plan în care se găsesc cei patru atomi de azot, aparținând celor patru nuclee pirolice reunite prin grupări metenice ($-\text{CH}=\text{}$) ce închid inelul porfirinic.

Fe^{2+} se combină cu atomii de N și de globină prin legături de coordinație. De globină se leagă prin intermediul a două molecule de histidină din lanțurile α și β (Fig.10.17.).

Hemul este un cofactor care conține un atom de fier ce servește la legarea unui gaz cum este oxigenul, în centrul unui inel larg heterociclic organic numit porfirină.

Toate porfirinele nu conțin neapărat un atom de fier, dar majoritatea metaloproteinelor, care conțin porfirine, au, de fapt, hemul ca unitate prostetică.

Aceste proteine se numesc și *hemoproteine* (Fig.10.18)

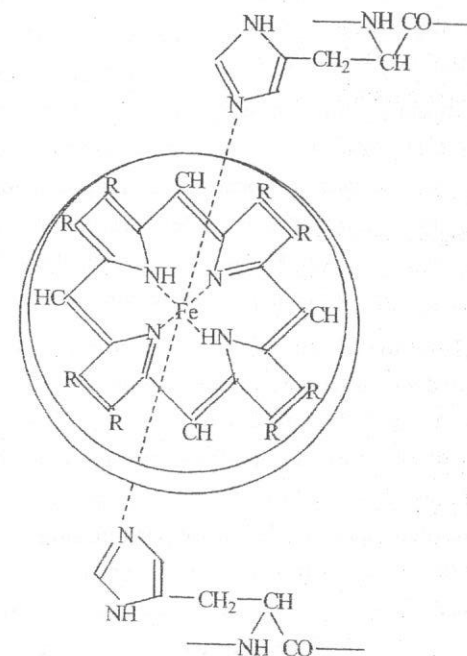


Fig.10.17. Legătura dintre atomul de fier și globină

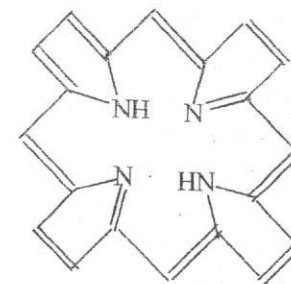


Fig.10.18. Structura porfirinei

Există mai multe tipuri de hem importante biologic. Tipul mai comun, care se găsește în hemoglobină și mioglobină se numește hem b. *Hemul b* nu are legătură covalentă cu apoproteina în care se găsește (Fig.10.15.).

Hemul a (Fig.10.14.) diferă de hemul b pentru că are un lanț metil lateral care este oxidat la grupa formil și un lanț vinil lateral înlocuit de un lanț izoprenoid. Ca și *hemul b*, hemul a nu are legătură covalentă la apoproteia unde se găsește. *Hemul c* diferă de hemul b prin aceea că două lanțuri vinil au o legătură covalentă cu proteina. Exemple de proteine care conțin hemul c sunt: citocromul c și complexul coenzima Q-citocrom c-reductaza. Citocromul c conține o grupare hemică c legată la ambele capete cu histidina și cu metionina.

Biosinteza hemoglobinei: Biosinteza hemoglobinei presupune în primul rând biosinteza hemului și a globinei și apoi unirea celor două componente.

La biosinteza hemului, în prima etapă se formează acid δ -amino-levulinic, apoi, două molecule de acid δ -amino-levulinic se condensează prin acțiunea δ -amino-levulinat-dehidrogenazei cu formarea de porfobilinogen. Se transformă apoi, prin dezaminare, patru molecule de porfobilinogen în porfirină.

Prin decarboxilări și oxidări succesive se produce protoporfirina. Fierul este introdus în moleculă sub acțiunea hemosintetazei, o enzimă mitocondrială.

Sinteza lanțurilor polipeptidice, din structura globinei, se realizează în eritroblastii din măduva osoasă și continuă în eritrocite. Fazele principale de reacție în procesul de sinteză sunt prezentate schematic în Fig.10.19.

Derivații hemoglobinei care pot fi prezenți în eritrocite în procesul de transport a gazelor de la plămâni la țesuturi și invers sunt: *oxihemoglobina*, *methemoglobina*, *carboxihemoglobina*, *carbaminohemoglobina*.

Cea mai mare parte din oxigenul trecut din alveole în sângele venos se fixează pe hemoglobina din hematii, formând complexul labil, *oxihemoglobina*, iar o cantitate de 1% se dizolvă în plasma sanguină.

Fenomenul de oxigenare, schimbă configurația hemoglobinei la fixarea și liberarea oxigenului.

Combinarea hemoglobinei cu oxigenul, într-un anumit situs al moleculei, determină schimbări conformaționale ce slăbesc legătura sa în alte situsuri ale moleculei.

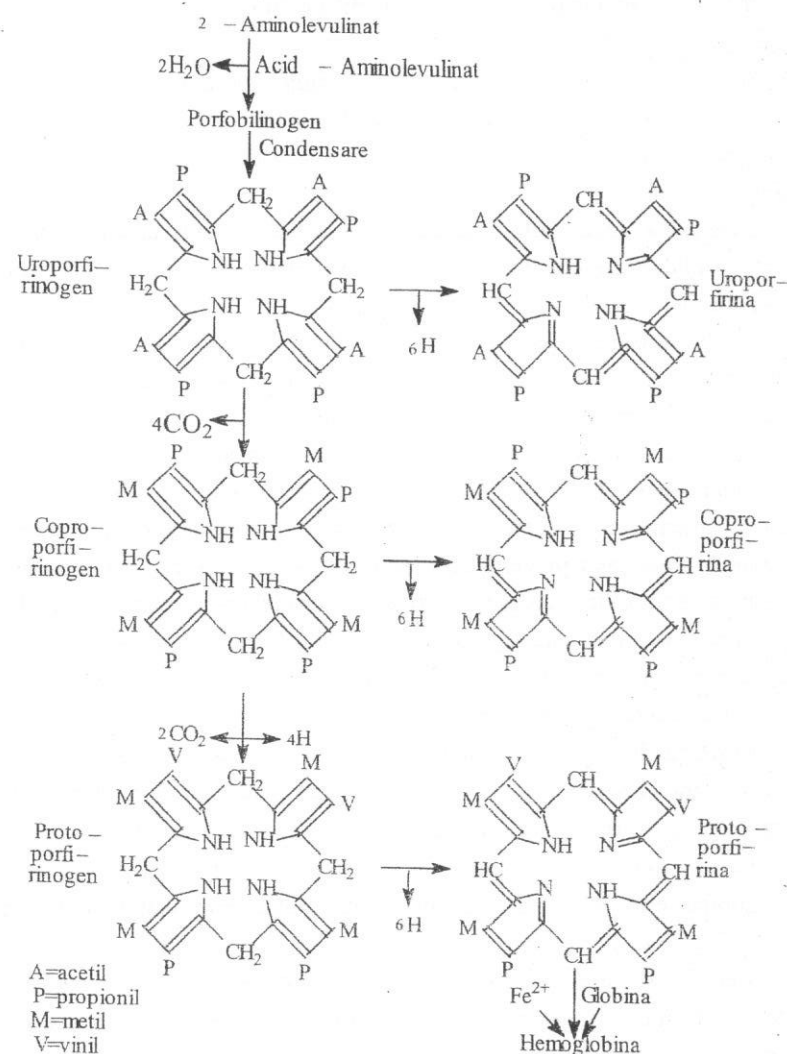
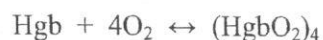


Fig.10.19. Biosinteza hemului și formarea hemoglobinei
 [A.Popescu, 1980]

Reacția de oxigenare a hemoglobinei (Hgb) este:



Reacția totală, de mai sus, se desfășoară în patru etape succesive, fiecare având constante de echilibru de oxigenare diferite:



S-a constatat că prima moleculă de oxigen se fixează lent pe tetramerul Hgb, a doua se fixează cu viteză crescută, iar a patra mult mai rapid. Unele studii au ajuns la concluzia că unitatea funcțională nu este tetramerul întreg al Hgb, ci dimerul $\alpha - \beta$, iar reacția de echilibru este:



Ca urmare a reacției oxigenului cu hemul unui lanț α , hemul suferă o modificare conformațională care se transmite lanțului β de care este legat. În noua sa conformație, lanțul β are o afinitate mai mare pentru oxigen. Procesul de oxigenare continuă până întregul tetramer este oxigenat.

În forma oxigenată, subunitățile moleculei de hemoglobină se pot mișca liber, independent una de alta. Lanțurile β sunt mai apropiate între ele. Lanțurile oxigenate ale tetramerului hemoglobinei sunt menținute împreună prin acțiuni electrostatice, la care participă aminoacizii C-terminali (două molecule de histidină și două molecule de arginină) a celor patru lanțuri polipeptidice.

Se stabilesc acțiuni electrostatice între restul de arginină din lanțul α cu grupările polare de la valină și acidul aspartic din lanțul α vecin și între resturile de histidină din lanțurile β cu gruparea ϵ -amino de la un rest de lizină dintr-un lanț α învecinat. Între cele două lanțuri β nu există o legătură directă. O legătură indirectă se stabilește prin 2,3-difosfoglicerat la Hgb dezoxigenată.

Afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este dependentă nu numai de structura moleculară și configurația electronică, ci și de concentrația unor compuși organici fosforici ca ATP și 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG).

2,3-DPG are aceeași concentrație molară ca și Hgb. Datorită fixării 2,3-DPG pe molecula de Hgb se produce scăderea afinității acesteia pentru oxigen.

Această acțiune face ca eritrocitul să-și regleze activitatea de transport a oxigenului pentru a asigura alimentarea țesutului în condiții defavorabile.

Methemoglobina (hemiglobina) are aceeași structură ca hemoglobina, cu deosebirea că fierul din structura hemului este oxidat la Fe^{3+} și nu mai poate fixa oxigenul pentru a fi transportat la țesuturi. În condiții normale methemoglobina se găsește în eritrocit în proporție de 1%, fiind menținută la acest nivel în special de acțiunea *methemoglobinreductazei*.

Hemoglobina se transformă în methemoglobină datorită diferitelor cauze:

1. Unele mecanisme de apărare celulară diminuate, ca de exemplu:
 - citocrom- b_5 reductaza, cunoscută și sub numele de methemoglobin reductaza care trebuie să convertească methemoglobina la hemoglobină.
2. Diferiți compuși farmaceutici:
 - unii anestezici locali;
 - nitrat de amidă, cloroquin, nitrați, nitriți, nitroglicerina, fenacetin, fenazopiridin, chinone, sulfonamide etc.
3. Agenți din mediul înconjurător:
 - compuși de arsen, clorbenzen, cromati, nitriți, nitrați, amine aromate, ingerare de paracetamol.

Methemoglobinemia se produce atunci când în sânge se formează mai mult de 3% methemoglobină din hemoglobina totală. Se poate ajunge la cianoze și chiar la hipoxie.

Carboxihemoglobina (HgbCO) se produce în urma fixării oxidului de carbon pe hemoglobină. Afinitatea hemoglobinei față de oxidul de carbon este mult mai mare decât aceea față de oxigen și formează o combinație mult mai stabilă. Aceasta duce la o reducere substanțială a capacității de transport a oxigenului la țesuturi de către hemoglobină. Rezultatul este hipoxia tisulară.

Oxidul de carbon se fixează pe componenta porfirinică a hemoglobinei și are loc o reacție reversibilă. Oxihemoglobina se poate refăce printr-o terapie îndelungată cu oxigen la o presiune mai ridicată.

Se menționează că la fumători concentrația oxidului de carbon în sânge poate determina formarea carboxihemoglobinei în proporție de până la 10%.

Carbaminohemoglobina, cunoscută și sub denumirea de *carbhemoglobina* sau *carbohemoglobina*, un compus al hemoglobinei cu dioxidul de carbon, este una din formele în care dioxidul de carbon există în sânge.

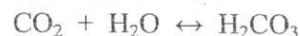
Dioxidul de carbon, ajuns din țesuturi în sânge, se fixează în proporție de 20% pe hemoglobină cu care formează compusul labil carbaminohemoglobina, care ajunge în plămâni.



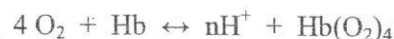
Hemoglobina poate transporta dioxidul de carbon datorită legăturii chimice a dioxidului de carbon cu grupa aminică a unor aminoacizi și foarte probabil cu a valinei. 20–25% din dioxidul de carbon transportat de sânge este legat sub formă de compus carbaminic:



75–80% din dioxidul de carbon este transformat în acid carbonic și apoi în ioni dicarbonici care difuzează în citoplasma eritrocitelor, unde se găsește în stare flotantă:



Afinitatea hemoglobinei pentru oxigen este influențată negativ de o serie de inhibitori ca: CO_2 , ionul de hidrogen (H^+), ionul de clor (Cl^-) și 2,3-bisfosfoglicerat (2,3BPG sau BPG). Oxigenul din plămâni, este capabil de a învinge natura inhibitoare a acestor compuși. În timpul legării oxigenului la hemoglobină, diferiți aminoacizi de la suprafața subunităților hemoglobinei disociază protoni, ca în ecuația de mai jos:



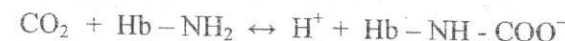
Disocierea acestor protoni joacă un rol important în expirația de CO_2 , care vine de la țesuturi. Însă, din cauza oxigenului din plămâni, pH-ul sângelui din plămâni (7,4–7,5) nu este suficient de scăzut pentru a exercita o influență negativă a legării oxigenului de hemoglobină. Când oxihemoglobina ajunge la țesuturi, unde concentrația în oxigen este suficient de scăzută, la fel și pH-ul (pH=7,2), au loc efecte favorabile eliberării O_2 .

Dacă luăm în considerare ce se întâmplă în țesuturi este posibil de a vedea cum CO_2 , H^+ și Cl^- exercită efectele lor negative asupra legării O_2 de hemoglobină. Metabolismul din celule produce CO_2 care difuzează în sânge și intră în sângele roșu care circulă de la celule. În sângele roșu care circulă de la celule CO_2 se transformă repede în acid carbonic prin acțiunea anhidrazei carbonice:



Ionul dicarbonat, produs în reacția de disociere, difuzează din celule, este transportat din sânge la plămâni, el reprezentând aproximativ 80% din CO_2 produs în metabolismul celular. Restul de aproximativ 20% CO_2 este transportat de sânge sub formă gazoasă. Așa cum s-a arătat mai înainte, în plămâni, la legarea efectivă a O_2 la hemoglobină se eliberează protoni. Protonii se combină cu dicarbonatul care sosește de la țesuturi și se formează acid carbonic care trece în CO_2 și H_2O și din alveolele plămânului și apoi sunt eliberate prin expirație.

Adaosul transportului izohidric de CO_2 de la țesuturi la plămâni este de 15% și se leagă la grupele aminice N-terminale de la hemoglobină. Această reacție prezentată mai jos, formează ceea ce se numește carbamino hemoglobină:



Reacția produce, de asemenea, H^+ și un pH coborât al țesutului la care concentrația CO_2 este crescută. Formarea H^+ duce la eliberarea O_2 legat din țesut. În plămâni, unde conținutul în O_2 este ridicat, O_2 este legat la hemoglobină concomitent cu eliberarea de H^+ . Protonii eliberați grăbesc disocierea carbaminei cu formarea CO_2 care este apoi eliberat prin expirație.

Conformația hemoglobinei și legarea oxigenului sunt sensibile la concentrația ionilor de hidrogen. Aceste efecte ale concentrației ionilor de hidrogen sunt responsabile pentru binecunoscutul efect Bohr, în care, creșterea concentrației ionilor de hidrogen descrește cantitatea oxigenului legat de hemoglobină la o anumită concentrație în oxigen (presiune parțială) (Fig.10.20.).

Efectul Bohr este proprietatea hemoglobinei (descriere făcută prima dată de danezul Cristian Bohr, în anul 1904) de a-și reduce afinitatea față de oxigen

în momentul creșterii presiunii parțiale a dioxidului de carbon sau la micșorarea pH-ului, ambele fiind legate deoarece dioxidul de carbon dizolvat în mediu apos este un diacid slab.

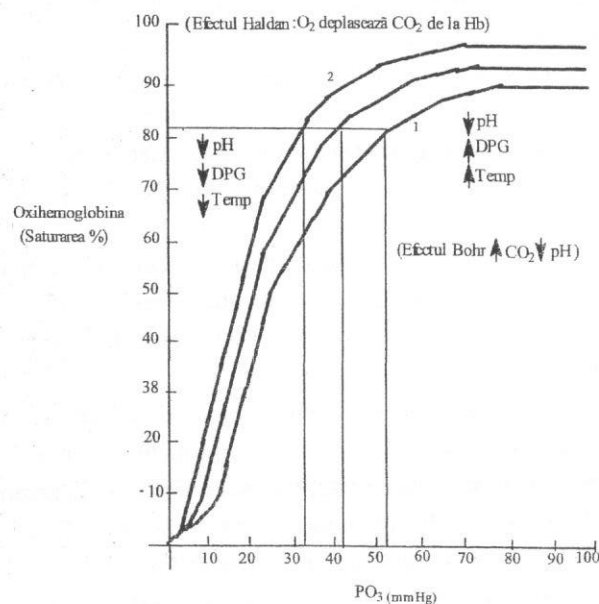


Fig. 10.20. Curba disocierii hemoglobinei.

Curba 1 corespunde cu deplasarea cauzată de efectul Bohr și curba 2 corespunde cu deplasarea cauzată de efectul Haldan

Legarea CO_2 la un acid aminat al hemoglobinei antrenează o modificare a conformației tridimensionale a sa și o diminuare a afinității pentru CO_2 . În plus, conformația hemoglobinei depinde de pH, ca toate proteinele.

Presiunea parțială în dioxid de carbon este crescută la nivelul țesuturilor.

Efectul Bohr are drept consecință o eliberare optimă a dioxidului transportat de hemoglobină la mușchi în special la eforturi fizice.

Creșterea temperaturii mediului și a concentrației în 2,3-bisfosfogliceratului diminuează afinitatea hemoglobinei pentru O_2 .

Deoxigenarea sângelui crește capacitatea de transport a dioxidului de carbon; această proprietate este efectul Haldan.

Molecule analoge hemoglobinei. Molecula de hem a hemoglobinei se aseamănă cu cea de la clorofilă, cu deosebirea că atomul de fier este înlocuit cu atomul de magneziu, ceea ce îi conferă culoarea de verde.

Hemocianina, o metaloproteină ce se găsește la nevertebrate (*artropode*, *moluște*), unde joacă un rol asemănător hemoglobinei. Locul activ din molecula sa conține doi atomi de cupru (gruparea prostetică), care leagă reversibil o moleculă de oxigen. Oxigenarea hemocianinei cauzează schimbarea culorii de la foarte slab verde-albăstrui la verde-albăstrui Cu(I) , a formei deoxigenate la verde-albăstrui Cu(II) , a formei oxigenate.

Hemocianina transportă oxigenul în hemolimfa celor mai multe moluște și a unor artropode. Cu toate că funcția respiratorie a hemocianinei este asemănătoare cu cea a hemoglobinei, sunt un număr însemnat de diferențe în structura moleculară și în mecanismul de acțiune.

În timp ce hemoglobina transportă oxigenul prin intermediul atomilor de fier din inelul porfirinic, hemocianina are ca grup prostetic doi atomi de cupru legați coordinativ la resturi de histidină.

Speciile care se servesc de hemocianină la transportul oxigenului sunt crustaceele comune, care trăiesc, în majoritate, în mediul marin, rece, cu oxigen la presiune coborâtă și oxigenul transportat reprezintă doar 25% față de hemoglobină, raportat la volumul de sânge.

Proteinele de transport pot fi afectate de inhibiția competitivă. Astfel, *monoxidul de carbon* concurează cu oxigenul pentru grupele reactive ale moleculei de hemoglobină. Dacă monoxidul de carbon este prezent în concentrație mare el împiedică oxigenul de a forma oxihemoglobina, care nu mai ajunge pe calea sângelui la țesuturi și organismul moare.

Cianura se fixează pe atomii de fier conținuți de hemoglobină și citocrom oxidaza. Aceasta din urmă, este responsabilă pentru transportul și utilizarea oxigenului în lanțul respirator mitocondrial. Dacă fixarea cianurii pe hemoglobină deplasează curba de saturare a hemoglobinei spre stânga (Fig.10.16.) și diminuează prin aceasta primirea oxigenului de către țesuturi, se produce moar-

tea prin intoxicație.

Este de temut, mai ales, acidul cianhidric, compus volatil foarte toxic.

Acest gaz se formează, în special, când cianurile sunt acidificate (în soluție sau suc gastric după ingestie). Intoxicarea cu cianuri se poate produce prin simplă ingestie a unor plante sau semințele unor fructe. Acestea din urmă conțin molecule de cianogen, *amigdalină*, care se descompun în intestin în glucoză, aldehydă și cianură sub acțiunea β -glucozidazei.

Eritrocitul sau *globula roșie* sau *hematia*, este o celulă a sângelui specializată în transportul gazelor respiratorii sanguine. Este de culoare roșie datorită pigmentului respirator, *hemoglobina*.

La om, eritrocitele sau globulele roșii sau hematiile, se găsesc în proporție de 4–6 miliarde de unități într-un litru de sânge (vezi capitolul 2.4.7.). Eritrocitele conțin 60% apă și 40% substanțe solide. 1000 ml globule roșii corespund la 1097 g, conțin 707 g apă, din care 500 g este apă liberă, 207 g este apă legată, 390 g reziduul sec, din care 330–360 g hemoglobină, 16,7 g alte substanțe solubile și 13,3 g stroma.

Hemoglobina asigură funcția fundamentală de transport a O_2 și CO_2 a eritrocitului, între plămâni și țesuturi. În sângele arterial hemoglobina se găsește numai ca oxihemoglobină. Alături de hemoglobină, în eritrocite se mai găsesc: *methemoglobina* și *carboxihemoglobina*.

Compoziția minerală a globulelor roșii este variabilă cu specia și diferită de cea a plasmăi. Dintre cationi se menționează K^+ , Na^+ , Ca^{2+} .

Potasiul este elementul preponderent și se găsește în medie 125 mEq/l (4,8g/l), cu o variație între 3,9–5,5g/l. Sodiul este mai puțin (20 mEq/l), în timp ce în plasmă sunt 142 mEq/l. Calciul se găsește de patru ori mai puțin decât în plasmă (0,025g/l). Dintre anioni predomină clorul, cu 50–60 mEq/l, în timp ce în plasmă este de 103 mEq/l. Anionul dicarbonic are o concentrație de 15 mEq/l și este mai puțin decât în plasmă.

Anionii organici: hemoglobina, acidul difosfoglicerice, acidul adenozinidifosforic, sunt în concentrație ridicată (75 mEq/l), iar în plasmă sunt reprezentați de unele proteine cu o concentrație de 15 mEq/l.

În cantități mici, în comparație cu plasma, se găsesc glucoza și ureea.

Colesterolul este prezent preponderent în stare liberă, spre deosebire de cel din plasmă care este 2/3 în stare esterificată.

În concentrații relativ mari se găsesc compușii fosforilați, fosfolipidele, acidul 2,3 – difosfoglicerice, hexozofosfații.

Glutathionul sanguin este localizat, în totalitate, în eritrocite, în cantități de 0,280–0,340g/l. Preponderent, este în stare redusă și are rolul de activator al enzimelor tiolice și ca factor de întreținere a integrității membranei eritrocitare.

În eritrocit se găsesc numeroase enzime profilate pe particularitățile sale metabolice și funcționale.

Citosolul este un lichid ce conține hemoglobina și celelalte proteine nehemoglobinice, enzime, glutathionul, compușii adenilici (mai ales ADT și ATP). Este prezentă și o proteină contractilă, *spectrina*, care menține forma biconcavă a discului eritrocitului.

Stroma este alcătuită preponderent din membrane celulare și din ultrastructuri interne. Ea este compusă din 60–70% proteine și 30–40% lipide. Principalul component proteic este o oligoproteină, *reticulina*. Se menționează, de asemenea, *glicoforina*, o glicoproteină membranară. Lipidele constau, în special, din *cefaline* (*fosfatidiletanolamina*, *fosfatidilserina*), *lecitine*, *sphingomieline*, *colesterol*, *esteri de colesterol*, *glicolipide*, *gliceride*.

Nevoile energetice eritrocitare sunt mici, celula fiind în incapacitate de a realiza sinteze puternic endergonice (reacție endergonică în care $\Delta G^0 > 0$, iar ΔG^0 este energia liberă de reacție standard particulară, în care concentrațiile componentelor sunt păstrate la valoarea de 1 molar cu excepția concentrației ionilor de hydrogen, care au o valoare de 10^{-7} ioni gram, litru).

Funcțiile endergonice pe care energia glicolitică le alimentează sunt:

1. păstrarea hemoglobinei în stare redusă, pentru ca ea să își poată exercita funcția respiratorie de transportor a O_2 și CO_2 ;
2. menținerea formei discoidale a eritrocitelor și a integrității structurale a membranei eritrocitare;
3. menținerea compoziției ionice intraglobulare.

În eritrocitul normal, circa 1% din hemoglobină se găsește sub formă de methemoglobină, în care fierul este sub formă oxidată (Fe^{3+}), inactiv la trans-

portul de oxigen.

Reducerea hemoglobinei în eritrocit pentru a o menține în formă funcțională, cu fierul în stare fieroasă (Fe^{2+}) se realizează prin intermediul *methemoglobin-reductazei*.

Menținerea formei discoidale biconcave a globulelor roșii este legată de integritatea membranei și de rezerva de ATP. În membrana eritrocitară s-a găsit un complex proteic format din *eritroactină* și *eritromiozină* activabile prin cefaline. Acest complex, care posedă activitate ATP-azică și proprietăți contractile, este implicat în transportul activ de Na^+ și K^+ . Forma biconcavă a eritrocitului este legată de prezența ATP. Dacă rezerva de ATP scade sub 50% din conținutul inițial, eritrocitul ajunge de formă sferică.

Homeostazia compoziției ionice eritrocitare este factorul care consumă cea mai mare cantitate de energie. Homeostazia se realizează prin transportul activ transmembranar cât și prin difuzia pasivă. Rezultanta este gradientul de concentrație a ionilor Na^+ și K^+ ce se stabilește între plasmă și eritrocit.

Sistemul respirator. Sistemul respirator este un sistem biologic al organismului care efectuează schimburile de gaze.

Aparatul respirator uman permite un schimb gazos între sânge și mediul exterior gazos. El furnizează dioxidul sângelui și expulzează din corp deșeurile gazoase, ca dioxidul de carbon, prin procesul de difuziune. Acest schimb are loc în plămâni, la nivelul alveolelor pulmonare și în mușchi.

Noțiunea de „respirație” reprezintă, de fapt, două procese: *mecanismele de inspirație și de expirație*, cu scopul de a furniza organismului oxigenul și de a elimina dioxidul de carbon.

Respirația este definită, de asemenea, ca un ansamblu de reacții chimice de oxidare, care consumă oxigen pentru degradarea materiilor organice, ca glucoza sau lipidele, din interiorul celulelor organismului. Aceste reacții care produc dioxid de carbon sunt, de fapt, respirația.

Unele animale au un sistem respirator cu caracteristici anatomice foarte simple.

Insectele posedă un sistem respirator constituit din trahei: tuburi care se deschid la exterior și care se ramifică în interiorul corpului pentru a distribui

direct dioxidul în organe. Grație acestui sistem, insectele nu au vase de sânge care să asigure transportul gazelor.

La amfibieni, pielea are un rol vital în schimbul gazos.

La păsări, sistemul respirator este mai complex și diferă de al mamiferelor și reptilelor. Principala sa caracteristică este de a asigura un aport constant de oxigen în sânge. Sistemul respirator al păsărilor le permite să-și regleze temperatura corpului iar la unele păsări, să-și poată reține respirația până la 7-8 minute etc.

La cei mai mulți pești respirația se face prin bronhii. Este un proces prin care animalul obține oxigenul din apă. Dar sunt și pești care au unul sau doi plămâni sau peștele de labirint care are dezvoltat un organ special ce permite de a lua oxigenul din aer nu cu ajutorul unui plămân adevărat.

Moluștele, în majoritate, au bronhii care le permit să treacă oxigenul din mediul apos într-un sistem circular. Aceste animale au o inimă care pompează sângele ce conține hemocianină, ca proteină respiratorie.

Cantitatea de oxigen consumată de către organismul uman, într-un minut, este de 250 ml. Volumul de oxigen dizolvat în sângele arterial este de 0,3 ml la 100 ml de sânge și de 2,5 ml dioxid de carbon.

Cantitatea de oxigen dizolvată fizic este neînsemnată față de cea legată chimic prin intermediul hemoglobinei. Adăugând sângelui un oxidant, care dislocă oxigenul de la hemoglobină, se pot extrage 19,5 volume % de oxigen. Cantitatea de dioxid de carbon extrasă din sângele total, prin adăugare de acid este de 50–60 volume % CO_2 .

Sângele arterial conține aproximativ 50–55 volume % CO_2 și cel venos, 55–60 volume %.

Cantitatea de oxigen cedată țesutului rezultă din diferența dintre concentrația sa în sângele arterial, care este 19,7 ml % și concentrația sa în sângele venos, care este de 15 ml %. Aceasta înseamnă că fiecare 100 ml sânge cedează 4,5 ml oxigen. Coeficientul de utilizare a oxigenului din sângele arterial este: $4,5:19,5 = 0,22$, care exprimă consumul tisular.

Acest coeficient se mărește prin creșterea debitului cardiac la efort fizic, precum și sub influența unor factori cum sunt: concentrația în CO_2 , a ionilor de hidrogen și a temperaturii crescute.

Un alt factor care poate influența cedarea oxigenului de către hemoglobină, este concentrația acidului 2,3-difosfoglicerat (2,3-DPG) eritrocitar, produs intermediar al procesului de degradare a glucozei.

Acidul 2,3-difosfoglicerat este un anion puternic care eliberează oxigenul din oxihemoglobină, legându-se la lanțurile β ale hemoglobinei. Cu creșterea concentrației în acid 2,3-difosfoglicerat se mărește cantitatea de oxigen eliberată de oxihemoglobină.

Respirația constă din totalitatea proceselor care privesc transportul oxigenului din atmosferă la țesuturi și transportul dioxidului de carbon, rezultat din oxidările tisulare, în atmosferă. Organul respirației externe, care reprezintă procesele de transport al oxigenului și dioxidului de carbon este plămânul.

Alveola este unitatea funcțională a plămânului. Aici, aerul vine în contact cu sângele aflat în capilarele pulmonare, prin intermediul endoteliului capilar și al membranei alveolare. Aerul alveolar se amestecă cu aerul atmosferic datorită mișcărilor respiratorii. Când plămânii sunt dilatați, aerul pătrunde în alveole, iar când sunt colabați este expulzat.

Presiunea intraalveolară, în inspirația normală, este de -3 mm Hg, iar în expirație de $+3$ mm Hg, modificările de presiune determinând pătrunderea și expulzarea aerului din alveole.

Schimburile gazoase prin care se fixează oxigenul și se eliberează dioxidul de carbon se petrec între alveole și sângele arterial. Dioxidul de carbon este foarte difuzibil și pătrunde ușor prin membranele organice din celulele organismului. Datorită schimburilor, aerul din alveole, continuu primenit, îmbogățește sângele în oxigen și își reduce conținutul în dioxid de carbon.

În efort, timpul în care sângele trece prin capilarele pulmonare scade de la 0,75 la 0,34 secunde, timp suficient, totuși, ca să se producă oxigenarea, deoarece, în cursul efortului și a creșterii consecutive a debitului cardiac, capilarele alveolare se dilată, fiind supusă procesului de hematoză o cantitate mai mare de sânge.

La nivelul țesuturilor se petrece un schimb invers, datorită presiunii parțiale scăzute a oxigenului, care oscilează între 30 și 60 mm Hg, în funcție de starea lor de activitate. Oxigenul trece dinspre sânge în țesuturi datorită diferenței de presiune parțială. Presiunea parțială crescută în țesuturi îi determină dioxidului de carbon trecerea în sângele venos, fiind apoi transportat spre plămâni.

Oxigenul transportat de sânge este fixat de hemoglobină care se transformă în oxihemoglobină.

Trecerea gazelor din aer în sânge și invers are loc prin traversarea membranei alveolo-capilare. Difuziunea depinde în primul rând de diferența de presiune parțială a gazelor, de proprietățile fizico-chimice, de grosimea și suprafața membranei alveolo-capilare. Pentru O_2 presiunea în aerul alveolelor este de 100 mm Hg, iar în sângele venos de 40 mm Hg. Pentru CO_2 presiunea în alveole este de 40 mm Hg, iar în sângele venos de 46 mm Hg.

Capacitatea de difuziune prin membrana alveolo-capilară pentru O_2 este de 15-20 ml Hg/min/mm Hg, în repaus și de 40-80 ml/min/mm Hg în cursul efortului. În repaus, consumul de O_2 este în jur de 250 ml/min și se produc 200 ml/min CO_2 , valorile variind mult în funcție de efort.

Moleculele gazelor se află în continuă mișcare, ceea ce duce la dezvoltarea unei anumite presiuni în funcție de numărul de molecule, volumul pe care îl ocupă, temperatura, fără ca presiunea parțială a unui gaz să afecteze presiunea altuia. Volumul gazelor care părăsesc plămânul se micșorează sub influența temperaturii, deoarece temperatura corporală de 37°C este, de obicei, superioară temperaturii atmosferice. În plus aerul expirat este saturat cu vapori de apă la o presiune parțială de 47 mm Hg.

Solubilitatea gazelor este mai scăzută în plasmă din cauza prezenței substanțelor solide dizolvate și a eritrocitelor. Solubilitatea CO_2 este mai mare decât cea a O_2 . În 100 ml sânge, la temperatura corporală se solvă 0,3 ml O_2 , 3 ml CO_2 și 0,8 ml N_2 .

Grosimea membranei alveolo-capilare este în jur de 1 μm .

Capacitatea de difuziune a plămânilor constă în abilitatea unui gaz de a trece dintr-o parte în alta a membranei alveolo-capilare în unitatea de timp la o anumită diferență de presiune parțială.

Capacitatea de difuziune a plămânilor pentru O_2 , în repaus, este de 15–20 ml/min/mm Hg, dar ea poate crește la 40–80 ml/min/mm Hg în condiții de efort sau hipoxie, prin intensificarea respirației și a circulației.

În cursul efortului, crește consumul de O_2 de la 250 ml/min, în repaus, până la 3–4 l/min. Consumul de O_2 crește treptat atingând un nivel de echilibru care se menține pe toată durata efortului. După încetarea efortului, consumul revine la valoarea de repaus.

Fiecare individ are un nivel maxim de efort pentru care își poate asigura consumul de oxigen. Adaptarea la efort se face prin mecanisme neurogene și chimice care realizează creșterea ventilației maxime de până la 130–150 l/min, precum și o creștere a debitului cardiac.

Factorul limitativ al adaptării la efort nu este respirația, ci sistemul cardiovascular.

Respirația tisulară reprezintă schimbul de gaze între sânge și țesuturi (*respirația internă*) și ansamblul oxido-reducerilor celulare, reprezentând respirația tisulară propriu-zisă.

Schimbul de gaze între sânge și țesuturi este determinat de presiunea parțială diferită a aceluiași gaz în sânge și în țesuturi. Presiunea parțială a oxigenului este mai mică în sângele din capilarele tisulare decât în țesuturi, datorită consumului său în celule.

Oxihemoglobina cedează țesuturilor o parte din oxigen, iar dioxidul de carbon difuzează din țesuturi în sânge datorită presiunii sale parțiale mai mari în țesuturi, ca urmare a formării sale permanente în celule în cursul respirației tisulare propriu-zise.

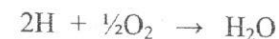
Respirația tisulară propriu-zisă reprezintă faza finală a catabolismului diferitelor substanțe (glucide, lipide, proteine) desfășurat pe seama unor reacții de oxido-reducere anaerobe și aerobe, în acest ultim caz, prin intermediul ciclului acizilor tricarboxilici. În lanțul oxido-reducerilor ce alcătuiesc ciclul acizilor tricarboxilici, este folosit oxigenul ca acceptor de hidrogen, rezultând apa metabolică, iar ca efect al unor decarboxilări succesive se eliberează dioxidul de carbon.

Mobilizarea și transportul electronilor de la donor la acceptor și activarea

acceptorului de electroni, în cadrul oxido-reducerilor respiratorii tisulare, se realizează prin intermediul unor enzime sau pigmenți respiratori: *dehidrogenază*, *citocromi*, *citocromoxidaze* etc.

În cursul oxido-reducerilor respiratorii, în special cele aerobe, sunt puse în libertate cele mai mari cantități de energie în raport cu celelalte reacții catabolice. Respirația tisulară, mai ales cea aerobă, reprezintă pentru organism procesul energogenetic, furnizând energia necesară desfășurării vieții.

Lanțul respirator. Etapa finală a oxidărilor biologice constă în combinarea atomilor de hidrogen, legați de coenzime, ai substratelor energetice, care au fost lăbilizați prin reacții de dehidrogenare, cu oxigenul molecular:



Ansamblul sistemelor redox și al enzimelor care participă la transferul echivalenților reducători, care sunt atomi de hidrogen sau electroni, de la coenzimele reduse până la oxigen se numește lanț respirator sau lanț transportor de electroni.

Compoziții lanțului respirator: substanțele oxido-reducătoare, enzimele, alți factori auxiliari, se găsesc în mitocondrii. Mitocondriile au fost prezentate în capitolul 2.2.3.4.

Compoziții lanțului respirator caracterizați structural și funcțional sunt: *NADH dehidrogenaza*, *coenzima Q*, *citocromii a, b, c, c₁*, *citocrom-oxidaza* (*citocrom a₃*).

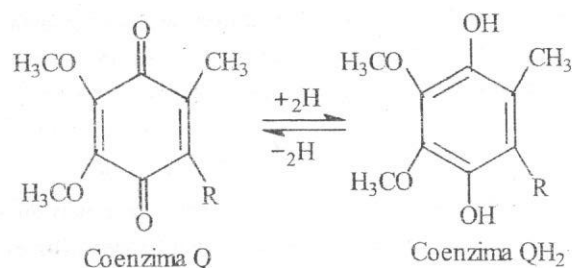
NADH dehidrogenaza este o enzimă care are drept grupă prostetică *FMN* (*flavin mononucleotid*). *NADH* = nicotinamidadenin dinucleotid (*difosfopiridin-nucleotid*).

Reacția catalizată de *NADH dehidrogenaza* constă în transferul unui electron sau a unui atom de hidrogen (echivalenți reducători) pe un acceptor care este coenzima *Q*. Coenzima *Q* este un derivat al 1,4-benzochinonei, posedă o catenă hidrocarbonată (*R*) cu o structură izoprenică nepolară, și asigură coenzimei *Q* dizolvarea în matricea lipoproteică a membranei mitocondriale interne.

Structura chinoidică a coenzimei *Q* o face aptă de a funcționa ca acceptor de hidrogen.

Citocromii sunt coenzime intermediare în lanțul respirator.

Citocromii sunt hemoproteine care funcționează ca transportori de electroni în lanțul respirator. Au ca grupare prostetică un hem format dintr-o porfirină (Fig.10.18.) complexată cu un atom de fier (Fe^{2+}). Atomul de fier este legat coordinativ la cei patru atomi de azot ai nucleului porfirinic și de alți doi liganzi externi de o parte și de alta a planului central.



Un cuplu oxido/reducător este următorul:



În mitocondriile celulelor mamiferelor se găsesc citocromii: a, b, c și c_1 , înglobați în matricea lipoproteică a membranei interne a mitocondriilor.

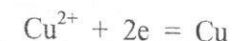
Prin potențialele lor redox, citocromii diferă între ei prin afinitatea pe care o au pentru electroni.:



Urmează apoi transferul electronilor de la citocromul b la citocromul c_1 și apoi succesiv la citocromii c și a.

Citocromul a redus cu Fe^{2+} este reoxidat prin interacțiunea sa cu citocromoxidaza (citocromul a_3). Citocromoxidaza acceptă electroni de la citocromul a redus pe care îl cedează apoi ionului molecular reducându-l. Aceasta este ultima reacție a lanțului respirator. Interacțiunea dintre citocromoxidază și oxigen are loc prin transfer de electroni și trecerea ionului de fier pe o treaptă superioară de oxidare. Nucleiele porfirinice sunt legate covalent de partea proteică a citocromilor (Fig.10.21.). Citocrom a_3 nu conține un nucleu de fier ci unul de cupru iar cuplul redox este Cu^{2+}/Cu .

Transportul electronilor are loc astfel:



Coenzima Q – citocrom-c-reductaza este un complex al lanțului oxidativ mitocondrial, al lanțului de transport electroni. În acest complex, citocrom-c-reductaza este o enzimă transmembranară care catalizează reducerea citocromului c, proces în cursul căruia doi ioni de H^+ sunt luați de coenzima Q, care este deci oxidată, iar cei doi ioni de H^+ trec în spațiul intermembranar a mitocondriei și vor participa la sinteza ATP.

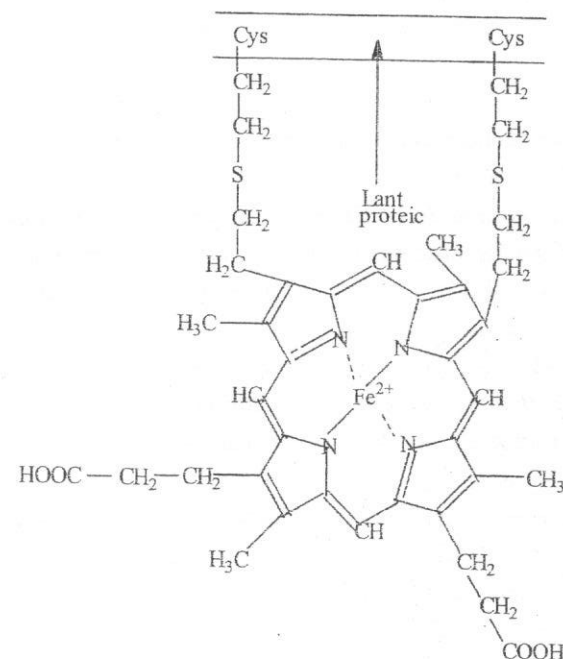


Fig.10.21.Citocrom c

Alți doi ioni de H^+ sunt extrași din matricea mitocondriei, reducându-se coenzima Q pentru reacția următoare.

Citocrom c este o hemoproteină solubilă, asociată cu membrana internă a mitocondriei, este un component esențial al lanțului respirator.

Mioglobina. Mioglobina este un component principal al fibrelor musculare scheletice și cardiace. Este o proteină globulară relativ mică, constituită dintr-un singur lanț polipeptidic cu masa moleculară de 16700–17000. Conține un grup prostetic, hemul, identic cu cel al hemoglobinei, capabil, reversibil, de oxigenare și deoxigenare.

Mioglobina este înrudită structural și funcțional cu hemoglobina. Mioglobina se găsește în celulele mușchilor scheletici și este deosebit de abundentă la mamiferele acvatice ca balena, foca și morsa, ale căror mușchi au culoarea maro închis din cauza cantității mai mari de mioglobină pe care o conțin.

Structura primară, secundară și terțiară a mioglobinei este bine cunoscută ca urmare a cercetărilor cu raze X ale lui J.C. Kendrew pe mioglobina din grăsimile de cașalot.

În anul 1957, John Kendrew și colaboratorii săi au determinat structura tridimensională a mioglobinei prin cristalografie cu raze X. Pentru această lucrare, împreună cu Max Perutz, în anul 1962 i s-a acordat premiul Nobel pentru chimie. Scheletul moleculei de mioglobină constă din opt segmente aproximativ drepte unite prin porțiuni curbate (Fig.10.23.).

Fiecare segment drept este un α -helix de dreapta. Cel mai lung segment conține 23 aminoacizi, iar cel mai scurt numai șapte. Cele opt α -helixuri sunt formate din circa 70% din aminoacizii din moleculă.

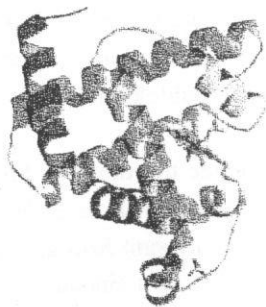


Fig.10.23. Structura schematică a mioglobinei în care se evidențiază domeniile elicoidale și hemul.

Mioglobina este o proteină de structură terțiară, ce se găsește la vertebrate, formată, la om, dintr-un singur lanț polipeptidic cu 153 aminoacizi, compus din opt helixuri α conținând un nucleu porfirinic (hemul) cu un ion de fier (Fe^{2+}) în centru.

Mioglobina este transportorul principal intracelular al oxigenului în țesuturile musculare și stochează oxigenul în mușchi. Este implicată, de asemenea, în degradarea NO produs în procesul respirației oxidative.

Ca și hemoglobina, mioglobina este constituită dintr-o parte proteică, globina și hemul, care este o porfirină în centrul căreia se găsește un ion Fe^{2+} cu șase valențe coordinative, dintre care patru sunt satisfăcute în ciclul porfirinic, una se leagă cu o histidină a lanțului proteic și la una se poate fixa o moleculă de oxigen sau alți liganzi fiziologici (NO în particular) sau o moleculă de CO_2 a cărei afinitate este apreciată a fi de 25000 mai mare decât a oxigenului.

Culoarea roșie a mioglobinei și abundența din unii mușchi sau la unele specii de vertebrate, explică diferența de aspect între carnea albă și carnea roșie. Această colorație provine din faptul că electronii π a dublelor legături a grupării hem absorb numai lungimile de undă înalte și din acest motiv nu reemit decât culoarea roșie caracteristică proteinei.

Mioglobina ia oxigenul de la hemoglobina din sânge și îl transportă în celulele mușchiului acolo unde este nevoie. O moleculă de mioglobină poate lega o moleculă de oxigen, dar cu o afinitate mult mai mare decât hemoglobina. Se încarcă cu oxigen la presiuni mult mai mici decât acelea la care se încarcă hemoglobina.

10.7.1.2. PROTEINE DE TRANSPORT A MOLECULELOR ȘI A IONILOR PRIN MEMBRANELE CELULARE

Membranele celulare sunt impermeabile pentru moleculele încărcate sau polare, motiv pentru care aceste molecule nu pot traversa spontan. Unele proteine de transport sunt specializate în transportul transmembranar. Astfel, se realizează transportul prin membrane a glucozei, aminoacizilor, a unor ioni, vitamine etc.

Difuzia facilitată este mediată de două clase de proteine diferite: proteinele

de tip carrier și proteinele canal.

Transportul prin membrane se desfășoară prin intermediul proteinelor de transport membranar, numite și *proteine carrier*. Acestea prezintă un situs specific de legare a substanței de transport, cu rol de substrat, și pot leaga specific câte o moleculă, suferă apoi o modificare conformațională și eliberează molecula pe fața opusă a membranei celulare.

Proteinele canal formează pori hidrofilici ce traversează bistratul lipidic, mozaicul fluid multicomponent. Acești pori au doar în două configurații posibile: închiși sau deschiși. Atunci când sunt deschiși, porii permit trecerea unor molecule specifice (de exemplu ioni anorganici) de pe o parte în cealaltă a membranei celulare.

Toate proteinele canal și o parte din cele carrier permit trecerea substanțelor în mod pasiv, adică în sensul gradientelor de concentrație sau electrice, procesul se numindu-se transport pasiv (difuzie simplă sau difuziune facilitată).

Membranele celulare mai conțin și proteine capabile să pompeze moleculele contra gradientului electrochimic, transportul activ, mediat de proteinele de tip „carrier”.

Transportul activ este posibil doar cuplat cu o sursă de energie metabolică (energia furnizată de hidroliza ATP).

Aquaporinele sunt proteine canal destinate moleculelor de apă.

Membrana celulară. Membrana celulară (membrana plasmatică, plasmalema) are o grosime de 6–9 nm, delimitează conținutul celular și reprezintă o barieră selectivă pentru traversarea moleculelor și ionilor. Asigură permeabilitate selectivă în celule și conferă din acest punct de vedere individualitate celulelor.

Membrana celulară este semipermeabilă, este un strat dublu de fosfolipide. Este comună tuturor celulelor vii, conține numeroase molecule biologice, în principal, lipide și proteine implicate într-o mare varietate de procese celulare. Servește în egală măsură pentru ancorarea la citoscheletul intracelular.

Rolul membranei celulare este: transportul de substanțe, asigurarea homeostaziei, protejarea spațiului celular, conferirea unei forme celulei, echilibrul osmotic, permeabilitatea selectivă, participarea în procesele metabolice.

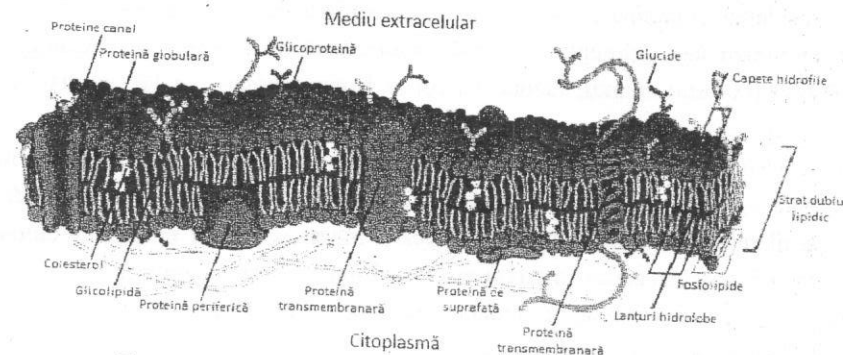


Fig.10.24. Diagramă cu detaliile unei membrane celulare.

Membranele biologice au o structură în general identică, de *mozaic fluid*, lipidoproteic. Este un fluid structural alcătuit dintr-un bistrat lipidic penetrat total sau parțial de molecule proteice. Între lipidele și proteinele membranare există, mai ales, legături necovalente.

Dublul strat lipidic sau *bistratul lipidic* al membranelor celulare este o componentă fundamentală, cu grosimea de 5 nm. Are structură fluidă și conferă membranelor proprietatea de membrană impermeabilă pentru moleculele hidrosolubile.

Membrana celulară este formată din *lipide* și *proteine*. Elementul structural fundamental al membranelor celulare este *dublul strat lipidic*, care se comportă ca o barieră impermeabilă pentru majoritatea moleculelor solubile în apă. Proteinele membranare, asociate dublului strat lipidic, asigură funcționarea membranei.

Membrana celulară conține trei tipuri de lipide: fosfolipide, glicolipide și steroli. Fosfolipidele și glicolipidele au un capăt hidrofil și altul hidrofob. 50% din fosfolipidele membranare sunt fosfogliceride, care sunt cele mai numeroase și sfingolipide, care conțin un aminoalcool (sfingozina) în loc de glicerol.

Glicolipidele membranelor celulare sunt diferite în funcție de specia animală și tisular specifică. Ele reprezintă 5% din lipidele ale monostratului extern. Colesterolul, un sterol, conferă membranei celulare rigiditatea, fiind poziționat între capetele hidrofobe ale lipidelor, împiedicându-le să se contracte.

Fluiditatea bistratului depinde de conținutul în colesterol al membranelor; concentrațiile mari de colesterol scad fluiditatea bistratului. Această scădere a fluidității duce la scăderea permeabilității pentru apă și moleculele hidrofile și la creșterea rezistenței mecanice a membranei celulare.

Fosfolipidele formează spontan bistratul deoarece au o regiune hidrofilă care este capabilă de a forma interacțiuni electrostatice sau legături de hidrogen cu moleculele de apă. Regiunile hidrofobe sunt insolubile în apă, ca urmare, moleculele de apă înconjoară aceste zone formând structuri asemănătoare unor cuști în care moleculele de apă se prezintă într-un aranjament mult mai ordonat decât apa care constituie mediul înconjurător.

Fosfolipidele refac bistratul spontan atunci când apar breșe în acesta.

Proteinele membranare reprezintă 50% din greutatea membranelor celulare și 75% din greutatea membranelor mitocondriale.

Proteinele sunt înglobate în masa lipidică a membranei (*proteinele transmembranare*) sau sunt asociate suprafeței membranei (*proteine membranare periferice* și *proteine legate prin lipide*). Există mai multe categorii de proteine: *proteine marker* (*proteine care identifică*), *receptori*, *de susținere*, *de transport*.

Unele proteine, numite *proteine integrale* pot penetra membrana în întregime datorită caracterului lor amfipatic. Regiunea centrală a lor, localizată în interiorul membranei, are caracter hidrofob. Domeniile hidrofile ale moleculelor proteice se găsesc pe fața extracelulară și citosolică a membranelor, în contact cu grupele polare ale moleculelor lipidice.

Lanțurile polipeptidice ale acestor proteine transmembranare, în formă de α -helixuri, pot realiza unul sau mai multe pasaje prin bistratul lipidic.

Conformația lanțurilor polipeptidice a proteinelor transmembranare poate fi și în formă de β -foaie pliată care favorizează formarea unor legături de hidrogen. α -Helixurile proteinelor transmembranare au funcția de ancorare de bistratul lipidic. Multe proteine transmembranare, care realizează un singur pasaj prin bistratul lipidic, formează homodimeri datorită interacțiunilor dintre domeniile α -helix adiacente, foarte importante pentru structura și funcția proteinelor canal și a proteinelor transportor.

Unele *proteine integrale* străbat parțial membrana și sunt integrate în bi-

strat.

Carbohidrații membranelor celulare reprezintă 2–10% din greutatea componentelor membranare. Oligo- și polizaharidele se leagă covalent de proteinele sau lipidele membranare formând glicoproteine și respectiv, glicolipide.

Majoritatea proteinelor de suprafață ale membranelor sunt glicoproteine și mai puțin de o zecime din moleculele lipidice membranare sunt glicozilate. Proteoglicanii sunt constituiți dintr-o componentă proteică din bistratul lipidic și o componentă polizaharidică. Lanțul polizaharidic rămâne în exteriorul celulei, fiind o componentă a matricei extracelulare.

Proteinele sunt implicate în transportul molecular și ionic transmembranar, în realizarea conexiunilor intercelulare, în ancorarea celulelor în matricea extracelulară, în desfășurarea reacțiilor enzimatice asociate structurilor membranare, și în imunitatea celulară.

Jonathan S. Singer și Garth L. Nicholson prezintă membrana celulară ca un *model fluid mozaicat*, unde numeroasele componente structurale se pot deplasa liber.

La suprafața membranei celulare animale se află proteine periferice și glucide sub formă de glicolipide și glicoproteine. Setul de proteine și glucide este specific și poartă numele de *glicocalix*.

Lipidele și proteinele membranare sunt antrenate în diferite tipuri de mișcări în interiorul membranei, datorită mobilității moleculelor lipidice. O moleculă lipidică străbate aproximativ 2 micrometri în timp de o secundă, adică poate să ajungă de la un capăt la altul al unei celule bacteriene de talia lui *E.coli*.

Moleculele lipidice rămân o lungă perioadă de timp în același monostrat. În membranele celulare există proteine denumite *translocatori fosfolipidici* sau *flipaze*, care intensifică o mișcare „*flip-flop*” rapidă din monostratul citosolic în cel lumenal. Distribuția asimetrică a componentelor lipidice pe cele două fețe a dublului strat lipidic, determină o fluiditate diferită a celor două straturi lipidice.

Transportul membranar. Existența celulelor depinde de o permanentă co-

municare cu mediul înconjurător. Un rol fundamental în această comunicare o are proprietatea de *permeabilitate selectivă* a membranelor celulare.

Consecința este menținerea homeostaziei celulare, adică asigurarea concentrațiilor intracelulare relativ cinstante ale substanțelor organice, ionilor, metabolizilor, menținerea unei activități metabolice stabile și reglarea volumului celular.

Transportul diferitelor subsatanțe prin membrană depinde de caracteristicile substanței transportate (masa moleculară, forma, dimensiunile, gradul de ionizare, gradul de hidratare și de compoziția chimică a membranelor, clasificându-se în:

- Transport de ioni și molecule mici prin mecanisme de difuziune sau mecanisme în care sunt implicate proteinele membranare.
- Transport de macromolecule prin vezicule delimitate de membrane.

Transportul membranar este asigurat de permeabilitatea selectivă a membranelor celulare.

În funcție de consumul energetic se disting: *transportul pasiv* fără consum de energie și *transportul activ* cu consum de energie prin intermediul ATP. În funcție de mărimea moleculelor transportate se citează transportul de ioni (molecule mici) și transportul macromoleculelor.

Transportul activ se face contra sensului gradientului de concentrație sau a gradientului electrochimic, adică a sensului spontan de difuziune, din regiunea unde concentrația atomilor sau a moleculelor este mai mică în regiunea unde concentrația lor este mai mare. Acest transport solicită consum de energie și este realizat de proteinele transportoare speciale.

Moleculele de dimensiuni mari (proteinele, lipidele acizii nucleici) nu pot trece direct prin plasmolemă, transportul lor realizându-se pe calea *endocitozei*.

Endocitoza este mecanismul de transport a moleculelor, chiar a particulelor (virale, bacteriene, etc.) spre interiorul celulei. Endocitoza este un fenomen membranar făcând parte din mecanismele de transport cu deplasare în spațiu. Se disting trei tipuri de endocitoză: *endocitoza*, *pinocitoza*, *fagocitoza*. Endocitoza are loc atunci când o parte a membranei înconjoară complet o particulă mai mică fără volum mare și o face să pătrundă din exterior spre interiorul unei

celule. Acest mecanism membranar este foarte important pentru viața unei celule, căci el permite internalizarea moleculelor, grație receptorilor specifici din celulă. Molecula endocitată se numește *ligand*.

Endocitoza unei molecule se desfășoară în mai multe etape:

- orientarea moleculelor către zonele membranei specializate în endocitoză;
- fixarea pe fața internă a membranei a unei rețele de complecși proteici care implică clatrina (o proteină structurală constituind învelitoarea unor vezicule);
- aceste molecule se polimerizează unele cu altele, urmează învaginarea în membrană, vezicularizarea, apoi detașarea și migrarea veziculei către interiorul celulei;
- în sfârșit, clatrinele se detașează de peretele veziculei, care devine o veziculă netedă, lucioasă.

Pinocitoza reprezintă ingestia de fluide sau de macromolecule cu ajutorul unor vezicule mici, cu diametrul inferior sau egal cu 150 nm.

Fagocitoza („alimentația” celulei) este absorbția de particule mari prin vezicule cu diametrul mai mare de 250 nm, putând atinge mai mulți micrometri: *fagosomii*.

În transportul activ, proteina transportor are și funcție ATP-azică și utilizează energia eliberată prin hidroliza ATP în procesul de transport. Proteinele transportor de tip ATPazică nu sunt singurele răspunzătoare de transportul activ prin membranele celulare.

Celulele au o clasă secundară de proteine care importă sau exportă ioni și molecule mici, cum sunt glucoza sau aminoacizii împotriva gradientului de concentrație, fără consum de energie provenită din hidroliza ATP.

Astfel de proteine utilizează energia gradientului electrochimic al Na^+ sau H^+ pentru a transporta simultan o altă substanță, proces denumit *cotransport*. Când molecula/ionul transportat și ionul cotransportat trec prin membrană în aceeași direcție, procesul se numește *cotransport*, iar când trec în direcții opuse, procesul este *antiport*.

Un exemplu de cotransport este importul glucozei sau a aminoacizilor în celulele epitelului intestinal sau a tubilor renali, împotriva gradientului lor de

concentrație, prin cuplarea la transportul în celulă a ionilor de Na^+ .

Transportul pasiv se realizează pornind din regiunea unde concentrația atomilor sau a moleculelor este mai mare spre regiunea unde concentrația lor este mai mică. Acest transport nu necesită consum de energie și are loc pe calea *difuziei simple* sau a *difuziei facilitate*.

Difuzia simplă se realizează prin porii formați de moleculele proteice sau cu participarea componentelor lipidice ale membranei. Difuzia facilitată este asigurată de proteinele transportoare din membrană numite *permeaze*. Permeaza leagă reversibil la un situs activ de pe fața membranei o singură specie moleculară sau molecule ce aparțin unei singure familii; se formează complexul permează-moleculă care traversează bistratul, disociindu-se pe cealaltă parte a membranei, cu eliberarea moleculei transportate.

Difuzia facilitată de proteine transmembranare străbătute de un canal delimitat de aminoacizi hidrofilii se numesc *proteine canal*, care sunt de mai multe tipuri în funcție de modul cum are loc deschiderea lor: canale dependente de potențialul de membrană (*canale dependente de voltaj*) sau de *ligand*.

Au fost identificate 13 tipuri de canale de transport pentru apă numite *aquaporine*, care transportă apa în și din celulă, prevenind trecerea ionilor și a altor substanțe. Aquaporinele au un rol determinant în homeostazia apei.

Neuroglobina. T. Burmester, B. Weich, S. Reinhardt and T. Hankeln (2000) au identificat existența unei noi globine, proteină transportoare de oxigen, care se găsește predominant în creier, numită neuroglobină, face parte din familia globinelor și este prezentă la toate vertebratele și la unele nevertebrate.

La om, neuroglobina este prezentă în concentrații submicro-moleculare în cele mai multe tipuri de celule și se găsește la un nivel ridicat în neuronii creierului, celulele retinei și unele celule endocrine, care s-au găsit localizate în mitocondrii, la nivele apropiate de concentrații milimolare.

În creierul uman, neuroglobina se găsește predominant în regiunile corticale cerebrale, structurile subcorticeale, asemenea talamusului și hipotalamusului, nucleii nervilor cranieni, în trunchiul cerebral și cerebel.

Neuroglobina este implicată în homeostazia oxigenului celular.

Homeostazia este capacitatea pe care poate să o aibă un sistem oarecare

(deschis sau închis) de a conserva echilibrul său de funcționare în ciuda constrângerilor exterioare.

Neuroglobina este o hemo proteină formată dintr-un lanț polipeptidic compus din 151 aminoacizi și o grupare prostetică.

10.7.2. PROTEINE INSOLUBILE

Proteinele insolubile sau scleroproteinele, numite adesea și albuminoide, sunt de natură fibrilară, foarte rezistente la digestia cu enzime proteolitice, se găsesc în regnul animal și sunt foarte răspândite mai ales la animalele superioare. În organism, au în mod obișnuit, funcții de susținere și de protecție. Conformația lor este mai simplă decât a proteinelor globulare, lanțurile lor polipeptidice sunt aranjate, de obicei, pe o singură dimensiune, adesea în mănunchiuri paralele.

În această categorie de proteine fac parte: *keratinele*, *colagenul*, *elastina*, *retiuculina*, *fibroina*, *draglina* (*mătasea de păianjen*), *spongina* (din buretele de mare), *gorgonina* (din mărgean), *rezilina* prezentă în articulația aripilor unor insecte, etc.

Chimia, fizico-chimia, biochimia, biologia și bioingineria acestor proteine insolubile, și mai ales despre colagene, se va trata pe larg în volumul al III-lea al acestei lucrări.

Keratinele sunt proteinele din epiderm, păr, lână, pene, unghii, copite, coarne. Ele se disting printr-un conținut mare de sulf, 3% în păr și lână, ceea ce corespunde cu 11–12% cistină.

Sunt insolubile în apă, în soluții saline, sunt rezistente față de acizi, enzime și mai puțin rezistente față de alcalii. Insolubilitatea keratinei se datorește unor legături transversale S–S între catenele sale polipeptidice.

Părul și lâna se dizolvă ușor în soluții apoase de sulfuri alcaline, care reduc grupele S–S la 2 S–H. Acidul tioglicolic și cianurile alcaline au acțiune similară. Legătura S–S poate fi ruptă și oxidativ cu apă oxigenată sau cu peracizi.

Fibroina, componenta fibroasă din mătasea naturală de *Bombix mori*, se găsește, în acest biocompozit, înconjurată de o componentă amorfă, *sericina*,

care reprezintă 30 % din greutatea totală.

Colagenul este cea mai importantă și cea mai abundentă proteină din organismul uman, el reprezintă componenta principală a țesuturilor conjunctive.

Cea mai importantă funcție a colagenului în organism este de a conferi rezistență și de a păstra integritatea structurală a țesuturilor în constituția cărora intră. Colagenul este unicul constituant al organismelor superioare care prezintă rezistență la tracțiune. Colagenul este bogat în glicină, prolină și hidroxiprolină, nu conține cistină și triptofan și are în constituție numai puțină metionină și tirozină. Macromolecula de collagen este formată din trei lanțuri polipeptidice sub formă de spirale cu răsucire de stânga, care la rândul lor se răsucesc împreună ca o elice de dreapta. Între cele trei catene, ca și între macromoleculele de collagen, se stabilesc legături de hidrogen transversale.

Prin încălzire prelungită cu apă, colagenul poate suferi un proces de hidroliză, se produc ruperi de legături covalente și se transformă în gelatină. Colagenul nativ este rezistent la acțiunea proteinazelor. Gelatina este ușor atacată de pepsină și de tripsină. Gelatina, prin răcire, se transformă în gel elastic în care conținutul în substanță uscată este de 2–3%.

Elastina este proteina cea mai importantă din țesutul conjunctiv al fibrelor elastice. Se găsește în cantitate mare în aortă, artere, în unele tendoane. Ea se aseamănă prin majoritatea proprietăților (constituție, solubilitate, unele funcții) cu colagenul. Se deosebește prin faptul că nu prezintă inhibiție, nu formează gelatină și este hidrolizată de tripsină. Elastina conține un procent ridicat de glicină, leucină și prolină și nu conține hidroxiprolină, alanină, aminoacizi dicarboxilici, triptofan și histidină.

10.7.3. PROTEIDE

Proteidele sau *proteinele conjugate* sunt combinații între o proteină și o componentă neproteică numită *grupă prostetică*. După natura grupei prostetice se disting mai multe clase de proteide: *fosfoproteide*, *lipoproteide*, *glicoproteide* sau *mucoproteide*, *cromoproteide*, *metalo-proteide*, *nucleoproteide*.

Fosfoproteide. Acidul fosforic, grupul prostetic al fosfoproteidelor esteri-

fică grupările hidroxilice de la serină și treonină ce intră în constituția componentei proteice. Fosfoproteidele au caracter acid, acidul fosforic din structura lor, exprimat în fosfor, reprezentând doar 0,1–1,1%. Sunt insolubile în apă și soluții acide, dar sunt solubile în soluții alcaline, mai ales în soluții de dicarbonați alcalini. Cele mai importante fosfoproteide de origine animală, sunt *cazeina* din lapte și *vitelina*, *vitelinina* și *fosvitina* din gălbenușul de ou.

Cazeina din laptele de vacă reprezintă 78% din totalul proteinelor prezente. Alături de cazeină, în lapte, se mai găsesc 17% α -lactalbumină, β -lactoglobulină, alte albumine și globuline. Cazeina din lapte este insolubilă în soluții acide și pe această cale se separă de celelalte proteine care rămân în zer.

Cazeina nu este o substanță unitară. Prin cromatografie și electroforeză s-au separat mai multe fracțiuni, dintre care patru sunt mai importante: α_{s1} -, α_{s2} -, β -, χ -. Greutățile moleculare ale lor variază între 16500 și 27000.

χ -Cazeina se deosebește de celelalte cazeine prin faptul că este solubilă ca sare de calciu. Ea formează complecși solubili cu celelalte cazeine. χ -cazeina este o glicoproteidă, singura cazeină care conține zaharuri.

Cazeina conține toți aminoacizii esențiali din punct de vedere alimentar, dar proporția lor variază de la o specie animală la alta. În cazeină, șase resturi de serină și un rest de treonină sunt esterificate cu acid fosforic, care se prezintă sub formă de sare de calciu.

Vitelina, *vitelinina* și *fosvitina* din gălbenușul de ou sunt mult asemănătoare cazeinelor din lapte și au același rol fiziologic de a furniza embrionului aminoacizii și fosforul pentru dezvoltare.

Lipoproteidele sunt constituite din molecule mari, masa moleculară depășind uneori 1000000. Ele au drept grup prostetic diferite lipide: colesterol, fosfolipide, gliceride, acizi grași. Faptul că lipoproteidele sunt constituite din componente proteice solubile în apă și componente lipidice hidrofobe, face ca ele să joace un rol important în permeabilitatea selectivă a membranelor.

Lipoproteidele sunt mult răspândite în organism. Se găsesc în membranele celulare și în elementele structurale ale celulelor. Lipoproteidele plasmatice sunt complexe în care lipidele și proteinele se află într-un raport relativ fix. Ele transportă lipidele insolubile în apă în diferitele organe, pe cale sanguină, sub

forma unor particule relativ mici.

Glicoproteidele sunt compuși de origine animală formați dintr-o proteină și un hidrat de carbon. Se numesc glicoproteide, proteidele care conțin mai puțin de 4% polizaharidă și mucoproteide cele care conțin mai mult de 4% polizaharidă. Dintre glicoproteide fac parte albuminele din ou și din ser, precum și unele globuline din ser care conțin hidrați de carbon.

În cartilagii, sunt prezente glicoproteide care conferă secrețiilor mucoase și lichidului sinovial din articulațiile vertebratelor calitatea de lubrifiant.

Cromoproteidele au drept grupe prostetice substanțe colorate. Ele prezintă diverse constituții și îndeplinesc roluri fiziologice în organism. Unele cromoproteide sunt considerate proteine respiratorii deoarece au rolul de a transporta oxigenul în diverse organe; din această categorie face parte *hemoglobina* care este transportor de oxigen în sângele vertebratelor.

Hemoglobina formează cu oxigenul molecular o combinație slabă, ușor disociabilă, *oxihemoglobina*, de culoare roșie și se disociază în capilarele sanguine punând oxigenul în libertate, de unde difuzează în țesuturi, servind la reacțiile de oxidare. La fel ca o moleculă de oxigen, dar mult mai strâns, se poate combina cu ferul din hemoglobină și o moleculă de oxid de carbon. Acțiunea toxică a oxidului de carbon asupra organismului animal se datorește blocării grupei prostetice a hemoglobinei. *Carboxi-hemoglobina*, ca și *oxi-hemoglobina*, este o combinație reversibilă și trece în oxi-hemoglobină, când concentrația parțială a oxigenului este mare.

Pigmenții vizuali, sunt cromoproteide, ca de exemplu, *rodopsina* din retină.

Mioglobina este o cromoproteidă din mușchi, asemănătoare hemoglobinei și reprezintă o rezervă de oxigen disponibil pentru oxidările celulare. Mio-globina se găsește în cantitate mai mare în mușchii care efectuează mișcări ritmice, cum sunt mușchii inimii, în mușchii pectorali ai păsărilor zburătoare.

O parte de cromoproteide sunt enzimele: *catalaza*, *peroxidaza*, *citocromii*, *flavinenzimele*, care participă la reacțiile de oxido-reducere celulară.

Hemoglobinele din sângele vertebratelor și a câtorva animale inferioare, au aceeași grupă prostetică, *hemul*, și se deosebesc prin componenta proteică, *globina*. Hemoglobina vertebratelor conține patru molecule de hem, deci patru

atomi de fer la fiecare mol. Hemul este o combinație complexă a ferului bivalent cu un colorant, *protoporfirina*.

Metaloproteidele sunt proteine conjugate în care metalul este legat direct la proteină, printr-o legătură complexă, nu prin intermediul unei grupe prostetice organice. Pigmenții respiratori din sângele moluștelor și al artropodelor, numiți *hemocianine*, sunt proteide care conțin cupru.

Hemocianinele sunt caracterizate prin mase moleculare foarte mari, între 500000 și 10000000 și sunt dizolvate în masa sanguină. În stare neoxigenată, hemocianinele sunt incolor sau gălbui, iar în stare oxigenată ele sunt albastre. La micșorarea presiunii parțiale de oxigen, oxihemocianinele elimină oxigenul absorbit.

Dintre metaloproteide, prezintă interes deosebit cele care au rolul de a transporta metale: *transferina* pentru fer, *ceruloplasmina* pentru cupru sau de a depozita metale: *feritina* pentru fer. De asemenea, prezintă importanță unele metaloproteide care sunt enzime: *ascorbatoxidaza* care conține Cu, *anhidraza carbonică* conține Zn.

Nucleoproteidele au drept grupe prostetice acizi nucleici, care se unesc cu proteine simple din categoria protaminelor și histonelor.

Se găsesc în toate celulele vii, inclusiv bacterii și viruși; sunt componente esențiale ale nucleelor, dar apar și în plasma celulară, precum și în multe sucuri și secreții ale organismului animal: lapte, fiere etc.

Deosebit de bogate în nucleoproteide sunt: timusul, pancreasul, splina, ficatul, leucocitele, spermatozoizii.

10.8. SEPARAREA, PURIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA PROTEINELOR

10.8.1. CONSIDERAȚII GENERALE

În vederea folosirii, orice produs chimic și mai ales farmaceutic, natural sau obținut pe cale de sinteză, este supus unor operații de purificare ce pot consta din:

a. operații primare de filtrare, centrifugare, sedimentare sau decantare;

- b. separări prin extracție cu solvenți, adsorbție, precipitare, ultrafiltrare;
- c. purificare prin precipitare fracționată, cromatografie și cristalizare.

De obicei, sunt aplicate grupuri variate de operații de purificare.

Extracția cu solvent, lichid-lichid este o tehnică importantă pentru obținerea unui mare număr de produse naturale la fermentarea bulioanelor. Exemple de produse care sunt obținute prin extracția cu solvent sunt: etanolul, acidul lactic, acidul citric, penicilina G., cefalosporina, streptomicina, vitamina B, riboflavina. Solventul este astfel ales pentru a înlesni selectarea și separarea cât mai bună a produsului în această fază.

Extracția cu fluid supercritic. Fluidele, dincolo de temperatura și de presiunea lor critică, se numesc fluide supercritice. Dioxidul de carbon a fost în cea mai mare măsură utilizat ca fluid supercritic pentru extracție în industria alimentară, dar și în alte sectoare cum ar fi cel farmaceutic. Costurile acestei tehnici împiedică însă extinderea aplicațiilor sale.

Metode bazate pe membrane. Pentru moleculele cu diametre în jur de 10Å–1000Å ultrafiltrarea poate fi folosită pentru concentrare și separare. Membranele compozite produc cele mai bune rețineri. Selecția membranelor are la bază, în primul rând, masa moleculelor ce urmează a fi separate.

Prevaporizarea constă într-o sorbție selectivă a unui lichid într-o membrană, difuzia lichidului prin membrană și conversia sa, în fază de vapor, pe cealaltă față a membranei indusă prin aplicarea vacuumului. Este un proces intensiv de energie care poate separa lichidele. Selectivitatea, un înalt coeficient de difuzie și rezistența mecanică sunt trei caracteristici ale acestor membrane.

Metodele cromatografice sunt indispensabile pentru izolarea produselor de înaltă puritate. Cromatografia de adsorbție pe silicagel sau alumină (trioxid de aluminiu) s-a practicat de chimiștii organicieni de zeci de ani. Adsorbantii sintetici neionogeni, ca rășinile de polistiren și rășinile de metacrilati se folosesc, de asemenea, pentru variate aplicații.

Practica curentă de purificare a proteinelor se poate divide în: metode cromatografice și necromatografice.

Metodele cromatografice au o înaltă rezoluție și sunt costisitoare. Tabelul 10.7. cuprinde diferitele metode de cromatografie existente în prezent.

Metodele necromatografice (Tabelul 10.8.) nu sunt tot așa de ușor de executat ca metodele cromatografice, sunt mai puțin precise și se realizează la un cost mai scăzut.

În ultimul timp s-au făcut eforturi de reducere a numărului de procese pentru purificarea proteinelor.

Cele mai multe se bazează pe înalta selectivitate a afinității unor liganzi la legarea moleculelor proteice.

Tabelul 10.7.

Diferitele metode cromatografice utilizate

Cromatografia cu schimbători de ioni
 Cromatografia pe bază de interacțiuni hidrofobe
 Cromatografia cu hidroxiapatită
 Cromatografia de afinitate cu metal imobilizat
 Cromatografia cu interacțiune tiofilică
 Cromatografia de inducție cu încărcare hidrofobă
 Cromatografia cu procedeu mixt de schimbători de ioni
 Cromatografia de afinitate
 Cromatografia de substituție

Tabelul 10.8.

Metode necromatografice

Precipitarea la punctul izoelectric
 Precipitarea cu săruri, polimeri, solvenți organici, surfactanți, ioni metalici
 Separarea a două faze apoase
 Trei faze de separare
 Cristalizarea
 Ultrafiltrarea

Cromatografia în strat expandat permite procesarea directă a suspensiilor brute. Ea utilizează un strat fluidizat, dar proprietățile hidrodinamice ale mediului cromatografic sunt asemenea ca ale unui strat compact. Materialele suspendate trec prin spațiile dintre particule și proteinele pot fi captate din mediu. Cromatografia în strat expandat poate fi realizată pe calea cromatografiei cu schimbători de ioni, a cromatografiei cu interacțiune hidrofobă sau a cromatografiei de afinitate. Avantajele cromatografiei în strat expandat sunt valoarea de tulburare, purificarea tehnică se combină cu clarificarea și concentrarea.

Cromatografia de afinitate a ionilor metalici imobilizați. Această metodă cromatografică folosește afinitatea ionilor metalici ca: Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} față de resturile de histidină, triptofan, fenilalanină, tirozină, prezente la suprafața proteinelor.

Poziția acestor resturi și alte proprietăți ale suprafeței proteinelor contribuie, de asemenea, la regimul de reținere a proteinelor în coloana cromatografică. Ionul metallic este coordonat la ligandul chelatic (doi din cei mai folosiți liganzi sunt acidul iminodiacetic și acidul nitrolotriatic) care este legat la un suport uzual (agaroza este cea mai folosită).

Afinitatea la precipitare. Această tehnică se bazează pe faptul că unii polimeri solubili în apă pot fi conjugați printr-o afinitate adecvată a ligandului. Complexul de afinitate format poate precipita din soluție. Proteina poate fi recuperată din acest complex de afinitate folosind cromatografia de afinitate.

Afinitatea ligandului facilitează trei faze de repartiție. Trei faze de repartiție este o altă tehnică de precipitare care exploatează sinergetic o sare și un solvent organic la precipitarea proteinelor.

Adăugarea sulfatului de amoniu și t-butanol la o proteină crează trei faze: o fază în partea superioară bogată în t-butanol, o fază apoasă inferioară și un precipitat interfacial proteic. Precipitarea în trei faze a fost în mare măsură folosită pentru purificarea unui mare număr de proteine.

Separări pe bază de membrană. Îndepărtarea substanțelor cu moleculă mică din soluțiile proteice sau din suspensii prin dializă este cel mai obișnuit și vechi exemplu de folosire a membranelor pentru purificarea proteinelor.

Microfiltrarea efectuată la presiunea de 0,1–1,0 bari reține particule cu mărimea de 0,1–10 μm și este folositoare, de exemplu, la îndepărtarea resturilor celulare din proba de proteină.

Ultrafiltrarea la presiune ridicată, de 0,5–10 bari poate separa proteinele între ele.

10.8.2. SEPARAREA PROTEINELOR DIN AMESTECURI

Proteinele sunt macromolecule cu mase moleculare diferite, care formează soluții adevărate, sunt electroliti cu aceeași comportare ca și electroliti mici.

Pe baza proprietăților caracteristice proteinelor globulare în soluție, se poate proceda la separarea lor din amestecurile de proteine în funcție de: masa moleculară, solubilitate, încărcarea electrică, diferențe în caracteristicile de adsorbție, afinitatea biologică față de alte molecule.

a) Separarea proteinelor bazată pe masa moleculară.

Proteinele globulare, aflate în soluție, pot fi separate de substanțele cu greutate moleculară mică, prin *dializă*, utilizând o membrană semipermeabilă, care reține moleculele de proteină și lasă să treacă moleculele mici dizolvate și moleculele de apă.

Un alt procedeu de separare a proteinelor de moleculele mici este *ultrafiltrarea* printr-o membrană semipermeabilă, sub acțiunea presiunii sau a forței centrifuge, pentru a separa prin filtrare moleculele mici dizolvate și moleculele de apă, de moleculele proteice.

Întrucât proteinele din soluție au tendința să sedimenteze în câmpuri centrifugale mari, se poate face separarea amestecurilor de proteine aplicând *centrifugarea în gradient de densitate*, folosită la separarea și a altor tipuri de macromolecule, a organelor celulare, a virusurilor.

În procedeul obișnuit, se prepară mai multe soluții de zaharoză cu densități diferite, care se adaugă, într-o eprubetă de plastic de centrifugă, pe rând, în cantități egale, începând cu soluția de zaharoză care are densitatea cea mai mare și apoi se adaugă celelalte cu densități descrescând. Amestecul de proteine, care trebuie separat, este depus în eprubetă deasupra soluției de zaharoză. Centrifugarea eprubetei, în poziție orizontală, într-un rotor la viteză mare, pro-

duce sedimentarea fiecărui tip de macromolecule, de-a lungul gradientului de densitate, în funcție de greutatea particulelor, dar și de densitatea și forma lor, dând naștere unor zone distincte. Se îngheață apoi eprubeta de plastic și se taie în felii subțiri pentru analiză [3].

O metodă eficientă de separare a macromoleculelor proteice în funcție de mărimea lor este *cromatografia de excludere moleculară*, numită și *cromatografia de „cernere moleculară”* sau *gel-filtrare*.

Conform metodei, amestecul de proteine dizolvat într-o soluție tampon adecvată, este trecut, datorită forței de gravitație, printr-o coloană încărcată cu un polimer inert, puternic hidratat și spălat cu soluția tampon. Se folosește Sephadex (un derivat polizaharidic) sau Bio-gel (un derivat de poli(acrilamidă) sau agaroză (un polizaharid).

Moleculele de proteine cu mase moleculare mari nu pot pătrunde în porii particulelor de polimer și trec rapid prin coloană. Celelalte molecule de proteine vor trece din ce în ce mai încet prin coloană, în funcție de mărimea lor moleculară. Se iau fracțiuni mici de eluent, li se determină concentrațiile proteice și se construiește o curbă de eluție.

b) *Separarea proteinelor bazată pe diferența de solubilitate*. Proteinele, în soluție, prezintă modificări în funcție de pH, tărie ionică, temperatură, proprietăți dielectrice ale solventului [3]. Fiecare proteină are o compoziție specifică în aminoacizi, care determină comportarea sa ca electrolit. Și de aceea, factorii menționați mai sus pot fi folosiți la separarea proteinelor din amestecuri.

Proteinele au valori diferite de pH izoelectric datorită conținutului diferit în aminoacizi cu grupări R ionizabile și, de aceea, ele pot fi adesea separate prin *precipitare izoelectrică*.

pH-ul la care o proteină este cel mai puțin solubilă este *pH-ul izoelectric* (pH_i), când molecula nu are încărcare electrică și nu se deplasează într-un câmp electric.

La pH_i nu există respingere electrostatică între moleculele de proteină vecine. La valori de pH deasupra și sub punctul izoelectric toate moleculele de proteină au o încărcare electrică de același semn și ele se resping prevenind agregarea moleculelor și formarea de precipitate. Când un amestec de proteine,

în soluție, este adus la pH_i al unei componente, cea mai mare parte sau toată componenta va precipita, lăsând în soluție proteinele cu valori ale pH_i deasupra sau sub acel pH.

Proteina precipitată la pH_i își păstrează conformația nativă și poate fi redizolvată la pH-ul corespunzător. Valorile pH_i al proteinelor depind și de natura mediului în care sunt dizolvate. Astfel, pH_i , ca și aspectul curbei de titrare acido-bazice ale unei proteine, se pot modifica în prezența sărurilor neutre care influențează gradul de ionizare a diferitelor lor grupe laterale R.

Dacă o soluție de proteină este dializată intens față de apa distilată, pentru a se îndepărta toți ionii mici, în afară de H^+ și OH^- , soluția proteică va ajunge la un anumit pH care este pH-ul *izoionic*.

pH-ul izoionic este o constantă pentru fiecare proteină.

c) *Salifierea proteinelor*. La concentrații mici în săruri neutre are loc creșterea solubilității proteinelor globulare. Sărurile divalente $[(NH_4)_2SO_4, MgCl_2]$ sunt mult mai eficiente decât sărurile monovalente ($NH_4Cl, NaCl, KCl$). Capacitatea sărurilor neutre de a influența solubilitatea proteinelor este în funcție de *tăria ionică* (mărime care măsoară concentrația și numărul de sarcini electrice ale cationilor și anionilor formați de sare) [3].

Creșterea solubilității proteinelor la concentrații mici de sare neutră se datorește tendinței grupelor R disociabile ale proteinei de a ioniza. Odată cu creșterea tăriei ionice, solubilitatea proteinelor începe să scadă. La o anumită tărie ionică, o proteină poate să precipite aproape complet din soluție, fenomen ce poartă numele de *salifiere*.

Salifierea are loc, printre altele, datorită îndepărtării apei de hidratare din molecula de proteină sub influența concentrației mari a sării neutre. Proteinele precipitate prin salifiere își păstrează conformația nativă și pot fi dizolvate din nou. Sulfatul de amoniu este preferat pentru salifierea proteinelor deoarece este foarte solubil în apă, realizându-se o tărie ionică mare.

d) *Fracționarea cu solvenți*. Adăugarea de solvenți organici, miscibili cu apa, mai ales etanolul și acetona, scade solubilitatea în apă a proteinelor globulare, acestea precipitând din soluție.

Atât etanolul cât și acetona au constante dielectrice mult mai mici decât ale apei (de exemplu, la 20°C, $\epsilon_{\text{apa}}=80$, $\epsilon_{\text{etanol}}=24$, $\epsilon_{\text{acetona}}=21$), ceea ce face ca la adăugarea lor în soluția proteică apoasă să crească forța de atracție dintre sarcinile de semn opus, scăzând astfel gradul de ionizare a grupelor R ale proteinei, iar moleculele de proteină au tendința de a se agrega și a precipita. Amestecurile de proteine pot fi separate pe baza diferenței cantitative a solubilității lor în amestecuri reci de etanol-apă sau acetona-apă [3].

e) *Influența temperaturii asupra solubilității proteinelor.* La majoritatea proteinelor globulare, cu creșterea temperaturii între 0° și 40°C, solubilitatea lor se mărește. Peste 40°–60°C cele mai multe proteine încep să se denatureze, ceea ce duce la scăderea solubilității lor la pH neutru. De aceea, procedeele de separare a proteinelor din amestecuri trebuie să aibă loc la temperaturi scăzute, oricum sub 40°C.

f) *Separarea proteinelor bazată pe încărcarea lor electrică* se bazează pe proprietățile lor acido-bazice, care sunt determinate de tipul și numărul grupelor laterale ionizabile R ale lanțurilor polipeptidice.

Fiecare proteină are proprietăți acido-bazice distincte, deoarece fiecare are componente și secvențe de aminoacizi diferite.

Pentru separarea și analiza amestecurilor de proteine, având la bază proprietățile lor acido-bazice caracteristice, se utilizează electroforeza și cromatografia de schimb ionic în diferite variante.

g) *Separarea proteinelor prin adsorbție selectivă.* Proteinele pot fi adsorbite și eluate în coloane cu materiale relativ inerte, foarte fin divizate. Se utilizează substanțe nepolare (cărbunele) și substanțe polare (silicagelul, gelul de aluminiu) [3].

Adsorbantul mult folosit pentru purificarea proteinelor este *hidroxiapatita* (fosfat de calciu cristalin), același mineral ce se găsește în oase. Grupele electronegative din moleculele de proteină se leagă de ionii de calciu ai rețelei cristaline ai hidroapatitei.

Proteinele pot fi eluate de pe coloanele de hidroapatită cu tampon fosfat.

10.8.3. EXTRAȚIA ȘI PURIFICAREA PROTEINELOR

Extracția și purificarea proteinelor este o problemă complexă având în vedere numărul mare de proteine, varietatea acțiunilor lor biologice și deosebirile chimice dintre proteinele omoloage din diferitele organisme.

De aceea, pentru fiecare proteină se alege o secvență de mai multe etape de separare, care să ducă la un grad cât mai înalt de purificare sau la creșterea activității biologice pe unitatea de greutate și la un randament cât mai mare.

Dintre procedeele de separare utilizate în etapele inițiale sunt: precipitarea izoelectrică, fracționarea prin salifiere, precipitarea cu solvenți.

Etapele premergătoare nu au putere mare de rezoluție și sunt urmate frecvent de procedee cromatografice.

10.8.4. CARACTERIZAREA MOLECULELOR DE PROTEINE

Proteinei separate și purificate trebuie să i se determine gradul de omogenitate. În acest scop se utilizează cromatografia de excludere moleculară, electroforeza pe gel de poliacrilamidă, focusarea izoelectrică, metode care au un grad ridicat de rezoluție ce pot detecta, cu ușurință, prezența unor cantități mici de impurități [4].

După stabilirea gradului de omogenitate a proteinei, aceasta poate fi caracterizată prin determinarea masei moleculare, dacă este formată din unul sau mai multe lanțuri polipeptidice, masa moleculară a fiecărui lanț, compoziția în aminoacizi a lanțurilor polipeptidice, secvența aminoacizilor în lanțurile polipeptidice etc.

Bibliografie selectivă

1. Chiriță Gh., Chiriță M., *Chimia Pielii*, Ed. a II-a, Ed. IPI, Iași, 1987
2. Chiriță M., *Biopolimeri și Compozite Naturale*, Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ, NR.1, Ed. Tehnică-Info, Chișinău, 2001
3. Chiriță M., *Substituenți sanguini*, Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ, NR.3, Ed. Tehnică-Info, Chișinău, 2001

4. Vandegriff K.D., *The Role of Oxygen and Hemoglobin Diffusion in Oxygen Transport by Cell-free Hemoglobins*, Blood Substitutes, Chapter 5, Academic Press, 2006
5. Dickerson R.E., Geis I., *Struktur und Funktion der Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstrasse, 1971
6. Nenițescu C.D., Vol. I și II, *Chimie Organică*, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980
7. Lehninger A.L., *Biochimie*, Vol. I și II, Ed. Tehnică, București, 1987, 1992
8. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu – Gheorghiu M., *Biochimie Medicală*, Ed. Medicală, București, 1980
9. Fasold H., *Die Struktur der Proteine*, Verlag Chemie, Frankfurt, 1972
10. Hendrickson J.B., Cram D.J., Hommond G.S., *Chimie Organică*, Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1976
11. Privalov P.L., *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 25, 1990
12. Murphy K.P., *Biophys. Chem.*, 51, 1994
13. Habermann S.M., Murphy K.P., *Protein Sci.*, 5, 1996
14. Strop P., Mayo S.L., *Biochemistry*, 39, p.1251, 2000
15. Lee K., Xie D., Freire E., Amzel L.M., *Proteins*, 20, p. 68, 1999
16. Arakawa T., Bhat P., Timasheff S., *Biochemistry*, 29, 1990
17. Arakawa T., Bhat P., Timasheff S., *Biochemistry*, 29, 1990
18. Liu Y. Bolen C.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1998
19. Wang A., Bolen D.W., *Biochemistry*, 36, 1997
20. Lin T-Y, Timasheff S.N., *Biochemistry*, 33, 1994
21. Creamer T.F., Srinivasan R., Rose G.D., *Biochemistry*, 36, 1997
22. Murphy K.P., Freire E., *Adv. Protein Chem.*, 49, 1992
23. Murphy K.P., Bhakuni V., Xie D., Freire E., *J. Mol. Biol.*, 227, 1992
24. Spolar R.S., Livingstone J.R., *Biochemistry*, 31, p.3947, 1992
25. Xie D., Freire E., *J. Mol. Biol.*, 242, 1994
26. Xie D., Freire E., *Protein Struct. Funct. Genet.*, 19, 1994
27. Spolar R.S., Record M.T. Jr., *Science*, 263, 1994
28. Freire E., *Arch. Biochem. Biophys.*, 303, 1993
29. Lee K.H., Xie D., Freire E., *Protein Struct. Funct. Genet.*, 20, 1994
30. Gomez J., Hilser J.V., *Protein Struct. Funct. Genet.*, 22, 1995
31. D'Aquino J.A., Gomez J., Hilser J.V., ET ALL., *Proteins*, 25, 1996
32. Hilser J.V., Gomez J., Freire E., *Proteins*, 26, 1996

33. Bardi J.S., Luque I., Freire E., *Biochemistry*, 36, 1997
34. Luque I., Gomez J., Semo N., Freire E., *Proteins* 30, 1998
35. Robertson A.D., Murphy K.P., *Chem. Rev.*, 97, 1997
36. Johnson C.R., Freire E., *Techniques in Prot. Chem.* VII, 1997
37. Lozaridis T., Archontis G., Karplus M., *Adv. Prot. Chem.* 47, 1995
38. Gracia – Moreno B.E., Dwyer J.J., Gittis A.G., Lattuman E.E., Spencer D.S., Stiter W.E., *Biophys. Chem.*, 4, 1997
39. Creamer T.P., Srinivasan R., Rose G.D., *Biochemistry*, 34, 1995
40. Gilis D., Rooman M., *J. Mol. Biol.*, 257, 1996
41. Gilis D., Rooman M., *J. Mol. Biol.*, 272, 1997
42. Vogt G., Woell S., Argos P., *J. Mol. Biol.*, 269, 1997
43. Takano K., Yamagata Y., Zutani K., *J. Mol. Biol.* 280, 1998
44. Malakauskas S.M., Mayo S.L., *Nat. Struct. Biol.*, 5, 1998
45. Freire E., *Adv. Prot. Chem.*, 51, 1997
46. Bhat T.N., Bentley G.A., Boulot G., Greene M.I., Tello D., Dall'Acqua W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1994
47. Todd M.J., Freire E., *Proteins*, 36, 1999
48. Freire E., *Methods Enzymol.*, 259, 1995
49. Pace C.N., Scholtz J.M., in *Protein Structure. A Practical Approach*, (Creighton T.E. ed.) Oxford University Press Inc., New York, 1997
50. Makhatadze G.I., *J. Phys. Chem.*, 103, 1999
51. Chamberlain A.K., Marquise S., *Structure*, 5, 1997
52. Qian H., Chan S.I., *J. Mol. Biol.*, 286, 1999
53. Bai Y., Milne J.S., Mayne L., Englander S.W., *Proteins*, 20, 1994
54. Swint – Kruse L., Robertson A.D., *Biochemistry*, 35, 1996
55. Bai Y., Sosnick T.R., Mayne L., *Science*, 269, 1995
56. Huyghes – Despointe B.M.P., Langhoest U., Steyaert J., Pace C.N., Scholtz J.M., *Biochemistry*, 1999
57. Jabs A., Weiss M.S., Hilgenfeld R., *J. Mol. Biol.* 286, 1999
58. Li R., Woolward C., *Protein Sci.*, 8, 1999
59. Chakshumathi G., Ratnaparkhi G.S., Madhu P.K., Váradarajan R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1999
60. Chiriță Gh., Chiriță M., *Pielea animală*, Editura Tehnică, București, 1993
61. Robertson A.D., *Chem. Rev.*, 97, 1997
62. Horpaz Y., Gerstein M., Chothia C., *Structure*, 2, 1994

63. *Medical Dictionary*, 29th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000
64. Bruce Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Edition, Garland Publishing, 1994
65. Verrall M., (ed), *Downstream Processing of Natural Products*, Chichester, John Wiley, 1996
66. Mc Gray K.P., Kaplan D.L., *Protein-based materials*, Boston, Birkhäuser, 1997
67. Bailey J.E., Ollis D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, Singapore, McGraw-Hill, 1986
68. Lutz H., Raghunath B., *Ultrafiltration process design and implementation*, in : Shukla A.A., Etzel M.R., Gadam S. (eds), *Process Scale Bioseparation for the Biopharmaceutical industry*, Boca Raton, FL, CRC Press, 2007
69. Ruckenstein E., Sun F., *Concentrated emulsion pathway to novel composite membranes and their use in pervaporation*, Ind. Eng. Chem. Res., 34, 1995
70. Przbycien T.M.; Pujar N.S., *Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography*, Curr. Opin Biotechnol., 15, 2014
71. Mondal K., Gupta M.N., *The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigm and expanding range of applications*, Biomol. Eng., 23, 2006
72. Mondal K., Roy I., Gupta M.N., *Affinity based strategies for protein purification*, Anal. Chem., 78, 2006
73. Gupta M.N., (ed), *Methods in Affinity-based Separation of Proteins /enzymes*, Basel, Birkhauser Verlag, 2012
74. Roy I., Sardar M., *Crosslinked alginate-guar gum beads as fluidised bed affinity media for purification of jacalin*, Biochem. Eng. J., 23, 2005
75. Sonnenfeld A., Thömmes J., *Expanded bed adsorption for capture from crude solution*, *Process Scale Bioseparation for the Biopharmaceutical Industry*, Boca Raton, FL, CRC Press, 2007
76. Jain S., Gupta M.N., *Purification of goat IgG immobilized metal ion affinity using crosslinked alginate beads*, Biotechnol. Appl. Biochem, 39, 2004
77. Roy I., Gupta M.N., *Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads*, Enzyme Microb. Technol., 34, 2004
78. Roy I., Jain S., Teotia S., Gupta M.N., *Evaluation of micro beads of calcium alginate for affinity chromatography of Aspergillus niger pectinase*, Biotechnol. Progr., 20, 2004

79. Jain S., Gupta M.N., *Purification of recombinant green fluorescent protein by three phase partitioning*, J. Chromatogr. A, 1035, 2004
80. Gupta M.N., Jain S., Roy I., *Immobilised metal affinity chromatography without chelative ligands – Purification of soybean trypsin inhibitor on zinc alginate beads*, Biotechnol. Prog., 18, 2012
81. Chaudhary R, Jain S., Muralidhar K., Gupta M.N., *Purification of bubaline luteinizing hormone by gel filtration chromatography in presence of Blue Dextran*, Process Biochem., 41., 2006
82. Ulber R., Plate K., Weiss T., Demmer W., Buchholz H., Scheper T., *Downstream processing of bovine lactoferrin from sweet whey*, Acta Biotechnol., 21, 2001
83. Branovic K., Buchacher A., Barut M., Strancar A., Josic D., *Application of semi-industrial monolithic columns for downstream processing of clotting factor IX*, J. Chromatogr. B., 790, 2003
84. Roy I., Gupta M.N., *Purification of alkaline phosphatase from chicken intestine by expanded bed affinity chromatography on dye-linked cellulose*, Biotechnol. Appl. Biochem., 32, 2000
85. Roy I., Mondal K., Gupta M.N., *Leveraging protein purification strategies in proteomics*, J. Chromatogr. B, 849, p. 32-42, 2007
86. Schultz R.M., *Proteins and Protein Structure*, Reference Module in Life Sciences, 2016
87. Zhou X., Xiong P., Wang M., Ma R., Zhang J., Chen Q., *Proteins of well-defined structures can be designed without backbone readjustment by a statistical model*, Journal of Structural Biology, Vol. 196, (3), 2016
88. Jeffery C.J., *Protein species and moonlighting proteins: Very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function*, Journal of Proteomics, Vol. 134, 2016
89. Baldwin M.A., *Peptides and Proteins Studied Using Mass Spectrometry*, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (3rd Edition), 2017
90. Shelar A., Bansal M., *Data on diverse roles of helix perturbations in membrane proteins*, Data in Brief, Vol. 9, 2016
91. Toth-Petroczy A., Palmedo P., Ingraham J., Hopf T.A., et al., *Structured States of Disordered Proteins from Genomic Sequences*, Cell, Vol. 167 (1), 2016

92. Shelar-A., Bansal M., *Helix perturbations in membrane proteins assist in inter-helical interactions and optimal helix positioning in the bilayer*, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, Vol. 1858 (11), 2016
93. Sheats M., Schroder H., Rausch F., Bohr C., et al., *Surfactant proteins of the human larynx*, Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger, Vol. 208, 2016
94. Vit O., Man P., Kadek A., Hausner J., Sklenar J., *Large-scale identification of membrane proteins based on analysis of trypsin-protected transmembrane segments*, Journal of Proteomics, Vol. 149, 2016
95. Mayne C.G., Arcario M.J., Mahinthichaichan P., et al., *The cellular membrane as a mediator for small molecule interaction with membrane proteins*, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, Vol. 1858 (10), 2016
96. Yeagle P.J., *Membrane Proteins*, The Membranes of Cells 3rd Ed., 2016
97. Stillwell W., *Membrane Proteins*, 2nd Ed., Academic Press, 2016
98. Verde C., Giodano D., Russo R., di Prisco G., *Transport and Exchange of Respiratory Gases in the Blood, Hemoglobin Differentiation in Fishes*, Encyclopedia of Fish Physiology, Academic Press, 2011
99. Mangin O., *High oxygen affinity hemoglobins*, La Revue de Médecine Interne, 2016
100. Arroyo P.J., Schweickert A.J., *Gases Inside the Body, Liquid Transport*, Back to Basics in Physiology, Chapter 5, Academic Press, 2015
101. Wilson R.M., *The role of hemoglobin oxygen affinity in oxygen transport at high altitude*, Resp. Physiology & Neurobiology, Vol. 158 (2-3), 2007
102. Al-Shura A.N., *Hemoglobin*, Hematology in Traditional Chinese Medicine - Cardiology, Chapter 4, Academic Press, 2014
103. Butcher J.T., Johnson T., Beers J., Columbus L., Isakson B.E., *Hemoglobin α in the blood vessel wall*, Free Radical Biol. and Med., Vol. 73, 2014
104. Randall D.J., *Transport and Exchange of Respiratory Gases in the Blood/Carbon Dioxide Transport and Excretion*, Encyclopedia of Fish Physiology, Academic Press, 2011
105. Gong M., Aguirre A.M., Bassi A., *Technical Issues Related to Characterization, Extraction, Recovery, and Purification of Proteins from Different Waste Sources*, Protein Byproducts, Chapter 5, Academic Press, 2016

CAPITOLUL 11

11. ENZIME

11.1.	Caracteristici generale	822
11.2.	Activitatea catalitică a enzimelor	825
11.3.	Cinetica reacțiilor catalizate enzimatic	830
11.3.1.	Efectul concentrației de substrat asupra activității enzimatic	832
11.3.2.	Efectul temperaturii asupra activității enzimatic	834
11.3.3.	Efectul pH-ului asupra activității enzimatic	835
11.3.4.	Influența activatorilor și a inhibitorilor asupra activității enzimatic	836
11.4.	Specificitatea catalizei enzimatic	839
11.5.	Enzime proteolitice	842
11.5.1.	Enzime proteolitice ale vertebratelor	842
11.5.2.	Enzime proteolitice ale sângelui	849
11.5.3.	Enzime proteolitice de origine vegetală	851
11.5.4.	Enzime proteolitice microbiene și fungice	852
	<i>Bibliografie</i>	854

11.1. CARACTERISTICI GENERALE

Enzimele, numite și fermenți, sunt biocatalizatori cu rol fundamental în reglarea proceselor metabolice, deoarece numai datorită acțiunii lor sunt posibile transformările chimice în organismele vii. Cu toate că enzimele sunt produse numai de către organismele vii, ele își pot exercita acțiunea, în medii controlate, și în afara organismelor.

În organismele vii se petrec cu o uimitoare ușurință, la temperatura și pH-ul fiziologice, un număr mare de reacții, pe care chimistul nu le-ar putea efectua în laborator decât lucrând la temperaturi și presiuni ridicate, în prezență de acizi sau baze tari, în dizolvanți neapoși sau cu catalizatori heterogeni anorganici. Printre aceste reacții sunt și degradări de molecule prin hidroliză sau oxidare, precum și sinteza de noi compuși cu o structură complexă.

Reacții enzimatice au fost folosite, din timpuri străvechi, pentru producerea vinului, oțetului, berii și a brânzei, dar abia în anul 1877 a fost utilizată denumirea de enzimă pentru substanța din drojdia de bere, cu rol de catalizator biologic, care produce „fermentația” zahărului cu formare de alcool.

În anii 1930–1936, J. Northrop a cristalizat enzimele: pepsină, tripsină și chimotripsină și s-a dovedit că enzimele sunt proteine.

În prezent se cunosc circa 2000 enzime, dintre care multe au fost izolate în stare pură, altele au fost cristalizate.

În organismele vii enzimele se găsesc în celule, țesuturi, organe și mai ales în organele cu rol important în metabolism, cum sunt ficatul, splina, tractul gastrointestinal. În celule, repartiția enzimelor este diferită în diversele formațiuni celulare. Astfel, în lizozomi sunt cele mai mari cantități de enzime, apoi în mitocondrii și în microzomi [4].

Deși, au fost identificate majoritatea enzimelor implicate în procesele metabolice ale celulei, trebuie elucidat controlul genetic al sintezei enzimelor, mecanismele moleculare de reglare a activității enzimatice, cum reușesc enzimele să catalizeze reacțiile chimice cu o astfel de eficiență, precizie și specificitate.

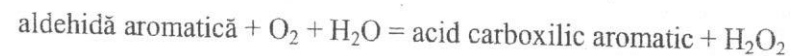
Enzimele care activează în interiorul celulelor se numesc *endoenzime* sau *enzime intracelulare*, iar cele care activează în lichidele extracelulare poartă numele de *exoenzime*.

Endoenzimele sunt puternic fixate pe suportul celular, de care nu pot fi separate decât prin distrugere mecanică. Exoenzimele, deși se formează în celule, sunt eliminate în lichidele din organism, unde își exercită acțiunea specifică (enzimele salivare, din stomac, pancreas, intestin etc.).

Pentru denumirea enzimelor, la multe dintre ele, s-a adăugat *substratului* sufixul „ază”, adică compusului asupra căreia enzima își manifestă acțiunea de cataliză. Astfel, *tirozinaza* catalizează hidroliza tirozinei, *carboxipeptidaza* catalizează hidroliza legăturii C-terminale din peptide, *carboxiesteraza* hidrolizează esterii diferiților acizi carboxilici etc. Nu întotdeauna s-a respectat această regulă, unele enzime primind denumiri chimice nesugestive ca: pepsina, tripsina, chimotripsina, catalaza.

Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC–IUBMB), pentru a veni în întâmpinarea reglementării nomenclurii enzimelor, domeniu care cunoaște o dezvoltare rapidă în știință și practică, recomandă nomenclatura și clasificarea enzimelor după reacțiile lor de cataliză.

Nomenclatura enzimelor după NC–IUBMB împarte enzimele în șase clase: *oxido-reductaze*, *transferaze*, *hidrolaze*, *liaze*, *izomeraze* și *ligaze* (Tabelul 11.1.) și în grupe de subclase, după tipul de reacție catalizată. Fiecare enzimă are o denumire comună potrivită cu folosirea curentă, o denumire sistematică care indică tipul de reacție catalizată și un număr de clasificare pentru identificarea corectă a unei enzime. Un exemplu de reacție de cataliză enzimatică:



Denumirea comună a enzimei respective este: aril-aldehid oxidaza.

Denumirea sistematică a reacției catalizate este: aril-aldehid: oxigen oxidoreductaza.

Numărul său de clasificare este EC 1, 2, 3, 9, unde EC este prescurtarea de

la „Enzyme Commission”, cifra 1 se referă la prima clasă de enzime, (oxido-reductaze), cifra 2 indică subclasa de oxigen oxidoreductaze, cifra 3 indică subclasa și cifra 9 indică numele comun, aril-aldehid oxidaza.

Tabelul 11.1.

Clasificarea internațională a enzimelor, cu indicarea claselor, a numerelor de cod și a tipurilor de reacții catalizate.

1. Oxido-reductaze (reacții de oxido-reducere)	2. Transferaze (transferă grupări funcționale)
1.1. Acționează asupra $\text{CH} - \text{OH}$	2.1. Grupări cu un carbon
1.2. Acționează asupra $\text{C} = \text{O}$	2.2. Grupări aldehidă sau cetonă
1.3. Acționează asupra $\text{C} = \text{CH} -$	2.3. Grupări acil
1.4. Acționează asupra $\text{CH} - \text{NH}_2$	2.4. Grupări glicozil
1.5. Acționează asupra $\text{C} - \text{NH} -$	2.5. Grupări fosfat
1.6. Acționează asupra NADH, NADPH	2.6. Grupări conținând S
3. Hidrolaze (reacții de hidroliză)	4. Liazze (adiție la dubla legătură)
3.1. Esteri	4.1. $\text{C} = \text{C}$
3.2. Legături glicozidice	
3.4. Legături peptidice	4.2. $\text{C} = \text{O}$
3.5. Alte grupări $\text{C} - \text{N}$	4.3. $\text{C} = \text{N} -$
3.6. Anhidride acide	
5. Izomeraze (reacții de izomerizare)	6. Ligaze (formare de legături cu scindare de ATP)
5.1. Racemaze	6.1. $\text{C} - \text{O}$
	6.2. $\text{C} - \text{S}$
	6.3. $\text{C} - \text{N}$
	6.4. $\text{C} - \text{C}$

11.2. ACTIVITATEA CATALITICĂ A ENZIMELOR

Enzimele sunt proteine sau proteide cu diferite grupe prostetice.

La enzimele de natură proteidică, componenta proteică poartă denumirea de apoenzimă, iar grupa prostetică, care este neproteică, de natură organică, poartă denumirea de *cofactor enzimatic* sau *coferment*.

În funcție de natura și tăria legăturii dintre apoenzimă și cofactor, componenta neproteică poartă numele de:

- grupare prostetică, când cele două părți sunt puternic legate;
- coenzime, când conțin cofactori ce pot fi transferați de la o apoenzimă la alta;
- activatori, substanțe care transformă enzima dintr-o stare inactivă în alta activă sau care stabilizează structurile de ordin superior, ca în cazul metal-enzimelor.

O delimitare clară între coenzime, grupări prostetice și activatori este greu de realizat.

Activitatea unor enzime depinde numai de structura lor ca proteine, în timp ce altele au nevoie de una sau mai multe substanțe neproteice, numite *cofactori*.

Cofactorul poate fi un ion metalic sau o moleculă organică neproteică numită *coenzimă*. Reacțiile la care participă coenzimele sunt reacții de transfer (de electroni, de protoni, de grupe fosfat etc.).

Se disting *coenzime activatoare* sau *grupe prostetice*, care sunt puternic legate de apoenzimă prin legături covalente, care nu se detașează de apoenzimă în cursul reacției și *coenzime transportoare* sau *cosubstrate*, care se disociază ușor de apoenzimă.

Complexul enzimă – cofactor, care are acțiune catalitică, poartă numele de *holoenzimă* (enzimă completă). La îndepărtarea cofactorului, enzima este catalitic inactivă și poartă numele de *apoenzimă*.

Apoenzima determină specificitatea de substrat (substanța asupra căreia acționează enzima) și de acțiune, decidând care anume dintre numeroasele posibilități de transformare ale substratului va fi urmată. Acest fapt este evi-

dențiat în cazurile în care același cofactor enzimatic poate cataliza reacții diferite.

Deși mai puțin specifici, cofactorii enzimatici participă activ la actul catalitic. Astfel, coenzimele sunt modificate structural în cursul procesului enzimatic și sunt refăcute, prin reacții ulterioare, în care intervine o a doua enzimă. Coenzimele participă la reacții de transfer (de protoni, de diferiți radicali organici, de grupări ortofosfat), realizând cuplarea a două reacții enzimatică: o enzimă transferă gruparea de la substrat la coenzimă și cealaltă o transferă de la coenzimă la cel de-al doilea substrat [3,4]

O apoenzimă poate reacționa cu anumite coenzime rezultând doar cataliza anumitor reacții specifice. Această specificitate este determinată de structura apoenzimei care activează grupările prostetice și mediază legarea enzimei de substrat.

Legarea coenzimei de apoenzimă se realizează prin mai multe tipuri de legături, diferit de la o enzimă la alta.

În molecula enzimei se află un *centru activ* prin intermediul căruia se realizează un complex enzimă-substrat și are loc procesul catalitic. În cazul enzimelor proteidice, din structura centrului activ face parte și cofactorul enzimatic.

Enzimele sunt compuși macromoleculari, nu sunt dializabile, se inactivează prin încălzire în aceleași condiții în care sunt denaturate proteinele. Acei reactivi care denaturează proteinele, inactivează, fără excepție, enzimele.

Uneori inactivarea, însoțită de denaturarea enzimelor, este reversibilă.

Solubilitatea enzimelor este asemănătoare cu cea a globulinelor.

Enzimele, ca toți catalizatorii, nu catalizează decât reacțiile termodinamic posibile, decurgând în sensul stabilirii unui echilbru.

Capacitatea de reacție a substanțelor poate fi mărită prin activarea lor, de exemplu, prin încălzire. Asemenea substanțe pot reacționa numai după absorbția unei anumite cantități de energie, numită *energie de activare*.

Chimia dispune de o modalitate de reducere a energiei de activare, respectiv, de accelerare a vitezelor reacțiilor prin adaosuri de substanțe, în cantități

foarte mici, numite catalizatori, care favorizează desfășurarea reacțiilor, coborând energia de activare.

Când o reacție poate fi catalizată atât de o enzimă cât și de catalizatori anorganici, se constată că reacția enzimatică decurge cu viteză mult mai mare. Rezultă că reacția enzimatică are o energie de activare mult mai mică.

Considerând că o substanță A se poate transforma într-o altă substanță B, mai săracă în energie, și reacția poate fi activată de catalizatori anorganici sau de enzime, energia de activare în cazul catalizatorilor anorganici este mult mai mare decât în cazul în când se desfășoară sub acțiunea enzimelor. Acest fapt este oglindit în Fig.11.1.

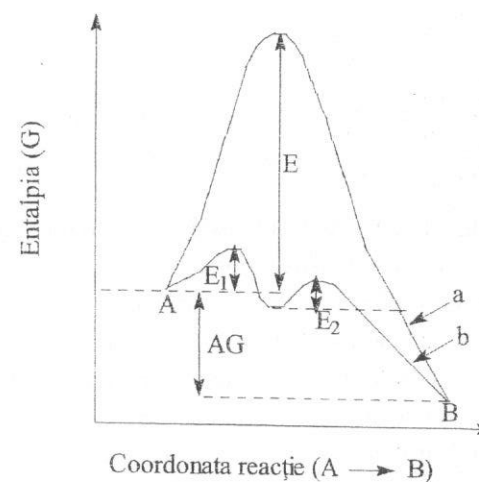


Fig.11.1. Variația entalpiei în cursul unei reacții
a.neenzimatică; b.enzimatică

E – energia de activare în reacția neenzimatică

E₁ – energia de activare în formarea complexului enzimă-substrat A

E₂ – energia eliberată la descompunerea complexului enzimă-substrat A în substanța B

În cazul când reacția nu este catalizată enzimatic, energia de activare este mult mai mare decât în cazul când se desfășoară sub acțiunea enzimelor.

Enzimele micșorează energia de activare și, prin aceasta, măresc viteza

reacțiilor chimice. Reducerea energiei de activare se realizează prin formarea între enzimă și substrat a unui sau mai multor complecși labili enzimă-substrat:



Complexul ES reacționează cu viteză mare cu un reactant X dând produsul sau produșii de reacție, regenerând enzima:



Sucesiunea aceasta de reacții este mult mai amplă, rezultând nu numai unul, ci mai mulți complecși.

Centrul activ al enzimei trebuie să ofere un acces steric perfect, care să se potrivească formei moleculei substratului. Aceasta este așa numita ipoteză „cheie-broască” [3].

Reacțiile biochimice, care implică transferuri de protoni intramoleculare și intermoleculare, prezintă caracteristicile catalizei generale, acide sau bazice.

Când între enzimă și substrat se stabilesc legături covalente, se realizează o cataliză covalentă, în care se pot distinge două tipuri de mecanisme: cataliza nucleofilă și cataliza electrofilă. În cazul catalizei covalente nucleofile, catalizatorul cedează o pereche de electroni substratului. Exemple de catalizatori nucleofili sunt resturile de cisteină și histidine, care prezintă atomi (sulf și azot) cu electroni neparticipanți.

În cazul catalizei covalente electrofile, substratul cedează o pereche de electroni catalizatorului electrofil (ioni metalici) [3, 4].

Enzimele sunt molecule mari, conținând de la câteva mii la câteva milioane de atomi de hidrogen. Substraturile pe care acestea acționează conțin doar câteva sute de atomi de hidrogen.

Din cauza acestei mari diferențe de lungime a catenelor, enzimele vin în contact cu substratul doar pe o anumită secvență, numită centru activ. Între substrat și centrul activ al enzimei se formează legături reversibile: legături covalente reversibile, electrovalente, de hidrogen, van der Waals.

Majoritatea substratelor se leagă de enzimă prin două sau mai multe puncte. O schemă a acțiunii enzimelor este dată în Fig.11.2.

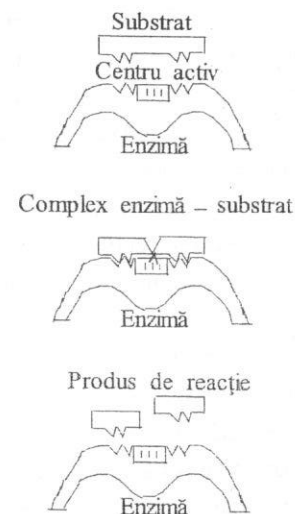


Fig.11.2. Diagrama de acțiune a enzimei

Reacția prezentată reprezintă o scindare.

Enzima este reprezentată ca o proteină liniară, fiind ilustrată numai porțiunea care conține centrul său activ. Substratul este atras din soluție de centrul activ prin grupele sale reactive. Substratul este fixat de centrul activ al enzimei și are loc catalizarea reacției, după care moleculele produsului (P) nou format părăsesc enzima care devine liberă pentru o altă captare și cataliză.

În structura substratului pot apărea variații ca urmare a unor reacții chimice cu alți compuși. Aceste reacții nu vor împiedica reacția enzimatică dacă nu se produc în zona în care centrul activ al enzimei vine în contact cu substratul.

Activitatea enzimelor nu durează indefinit. În timp, cantitatea de substrat transformată de enzime scade, ajungându-se la inactivarea lor. Inactivarea se explică prin denaturarea enzimelor sau a altor transformări specifice proteinelor globulare.

11.3. CINETICA REACȚIILOR CATALIZATE ENZIMATIC

Pe baze cinetice, reacțiile chimice pot fi clasificate prin ordinul de reacție: reacții de ordinul zero, unu, doi și trei, în funcție de modul cum viteza de reacție este influențată de concentrația reactanților în condițiile date.

O serie de reacții enzimatică sunt de ordinul zero în raport cu reactanții. Viteza de reacție depinde de concentrația catalizatorului sau de un alt factor, altul decât concentrația reactanților.

Reacțiile de ordinul întâi se desfășoară cu o viteză direct proporțională cu concentrația unuia dintre reactanți. Un exemplu simplu este cazul când viteza de reacție este direct proporțională cu concentrația molară a lui A:



Viteza de reacție în orice moment t este dată de o ecuație de viteză de ordinul întâi:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]$$

unde $[A]$ este concentrația molară a lui A, iar $-d[A]/dt$ este viteza cu care scade concentrația lui A. Constanta de proporționalitate k este constanta de viteză sau viteza de reacție specifică [1].

La reacțiile de ordinul al doilea viteza de reacție este proporțională cu produsul concentrațiilor a doi reactanți:



Viteza de reacție, $-d[A]/dt$, $-d[B]/dt$ sau $+d[P]/dt$ este proporțională cu produsul concentrațiilor lui A și B, așa cum rezultă din ecuația de viteză de ordinul al doilea [1]:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B]$$

unde, k este constanta de viteză.

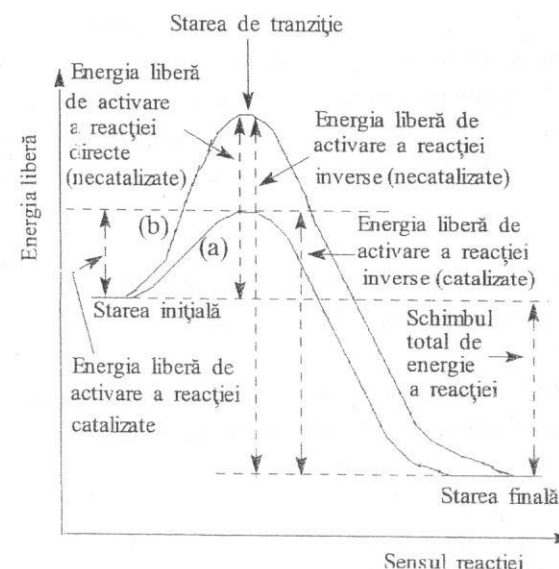


Fig. 11.3. Variația energiei libere în timpul unei reacții catalizate (a) și necatalizate (b).

Reacția de ordinul doi, $A + B = P$, în anumite condiții, poate fi de ordinul întâi. De exemplu, dacă concentrația lui A este foarte mare și a lui B foarte mică, viteza de reacție este practic proporțională cu concentrația unui singur reactant, a lui B.

La reacțiile de ordinul trei, relativ rare, viteza de reacție este proporțională cu produsul a trei factori de concentrație.

Vitezele de reacție pot fi și de ordin mixt.

O reacție chimică, $A \rightarrow P$ are loc deoarece o parte din moleculele A au energia necesară de a ajunge la o stare activată, numită *stare de tranziție* când

este posibil să se formeze o legătură chimică sau să se distrugă formându-se produsul P (Fig.11.3.).

Viteza unei reacții chimice este proporțională cu concentrația substanțelor aflate în starea de tranziție. Energia liberă de activare ΔG este cantitatea de energie necesară pentru a aduce un mol de substanță, la o anumită temperatură, în starea de tranziție. Viteza reacției chimice poate fi accelerată prin creșterea temperaturii sau prin adăugarea de catalizatori.

Catalizatorii se combină pentru scurt timp cu reactanții, aducându-i la starea de tranziție cu o cantitate de energie de activare mai mică decât în absența catalizatorilor. O dată cu formarea produșilor de reacție catalizatorul este eliberat (Fig.11.3.).

11.3.1. EFECTUL CONCENTRAȚIEI DE SUBSTRAT ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Principiile cineticii reacțiilor chimice sunt aceleași și la reacțiile enzimatice, cu deosebirea că la reacțiile enzimatice are importanță deosebită saturarea cu substrat.

Cu creșterea concentrației substratului, crește viteza reacției enzimatice până la un maximum (care este mult superior concentrațiilor fiziologice), după care se menține constantă (Fig.11.4.).

La o concentrație mică de substrat, viteza de reacție inițială v_0 este aproximativ proporțională cu concentrația substratului.

Cu creșterea puternică a concentrației substratului viteza de reacție devine independentă de concentrația substratului și atinge asimptotic o valoare constantă.

Pe acest interval, se consideră că enzima este saturată de substrat.

Teoria Michaelis-Menten presupune că enzima E se combină mai întâi cu substratul S pentru a forma complexul enzimă-substrat, ES, care se descompune, într-o etapă următoare, formând enzima liberă și produsul P (Fig.11.4.):

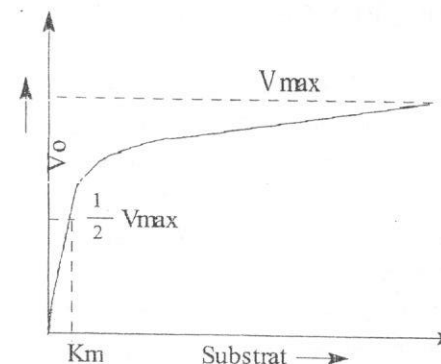


Fig.11.4. Influența concentrației substratului asupra vitezei unei reacții catalizate enzimatic



Aplicând legea acțiunii maselor la reacția dintre enzimă și substrat [1], se poate scrie :

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (3)$$

unde K_m = constanta lui Michaelis-Menten, indicator al afinității enzimei pentru substrat.

Introducând valoarea concentrației totale a enzimei E_0 și a concentrației enzimei libere $[E] - [ES]$, se obține relația :

$$[S]\{[E_0] - [ES]\} = K_m [ES] \quad (4)$$

de unde,

$$[ES] = [E_0] \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Întrucât viteza reacției, v , va fi cu atât mai mare cu cât va fi mai mare valoarea complexului ES, se poate considera că viteza maximă de reacție, notată cu $V_{\max}$, va fi în momentul în care toată enzima se va afla legată în ES, ceea ce face posibilă relația :

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_0]} \quad (5)$$

Prin înlocuirea lui $[ES]$ cu valoarea sa din relația (4) rezultă valoarea vitezei de reacție în funcție de K_m , $[S]$ și $V_{\max}$, care este ecuația Michaelis-Menten :

$$v = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Constanta Michaelis-Menten (K_m) este o măsură a afinității enzimei pentru substratul asupra căruia acționează.

O valoare ridicată a acestei constante, indică faptul că enzima manifestă o mică afinitate pentru substratul asupra căruia acționează și presupune că această enzimă catalizează modificări biochimice a unor substanțe cu structuri chimice asemănătoare.

O valoare mică a lui K_m arată o înaltă afinitate a enzimei pentru substrat și presupune o *strictă specificitate de substrat*.

11.3.2. EFECTUL TEMPERATURII ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Ca și în cazul reacțiilor chimice, viteza reacțiilor catalizate de enzime crește cu temperatura, în intervalul în care enzimele își păstrează stabilitatea. Viteza de reacție a enzimelor, la o creștere a temperaturii cu 10°C se mărește cu un coeficient de 1,5–3,0.

Cele mai multe enzime au activitate optimă la temperatura fiziologică, în jur de 37°C . Enzimele fiind proteine, cu creșterea temperaturii, suferă un proces de denaturare, care scade activitatea enzimatică, până la inactivare, iar

denaturarea este obișnuit ireversibilă.

Majoritatea enzimelor sunt inactivate la $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$.

Unele enzime, ca ribonucleaza, devin inactive prin încălzire, dar își recapătă activitatea la răcire.

Enzimele unor bacterii termofile, care trăiesc în apa izvoarelor termale, își păstrează activitatea și peste 90°C .

Papaina, de asemenea, rezistă la temperaturi mai ridicate de 60°C , cu condiția ca valoarea pH-ului să fie mai mare decât 4, deoarece altfel se denaturează ireversibil.

La temperaturi mai scăzute decât temperatura optimă, activitatea enzimatică scade, enzimele devin inactive, dar la ridicarea temperaturii activitatea enzimatică revine la normal. Așa se explică rezistența la ger a semințelor, care sunt apoi capabile să germineze.

Temperatura optimă de acțiune a enzimelor este specifică fiecărei enzime și ea este influențată de concentrația enzimei, concentrația ionilor de hidrogen, de prezența diferitelor impurități etc.

11.3.3. EFECTUL PH-ULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Enzimele sunt active numai într-un domeniu limitat al concentrației ionilor de hidrogen și în majoritatea cazurilor efectul catalitic este maxim la o anumită valoare de pH.

Majoritatea enzimelor au o activitate optimă în vecinătatea valorii fiziologice a pH-ului.

Un număr redus de enzime fac excepție de la această regulă.

Astfel, pepsina este activă la $\text{pH}=1\text{--}4$, cu un maximum de activitate la $\text{pH}=1,8$.

Câteva enzime au o activitate catalitică maximă în mediu alcalin.

Argininaza, în prezența Mn^{2+} , are acțiune optimă la $\text{pH}=10$. Valoarea optimă de pH a argininazei este influențată de natura chimică a ionului metalic activator. De asemenea, aceeași enzimă, din semințele de *Phaseolus vulgaris*, parțial purificată, prezintă două valori optime de activitate la $\text{pH}=7,3$ și $\text{pH}=8,7$.

Relația dintre pH și activitate, pentru orice enzimă, este în funcție de comportarea sa și a substratului față de acizi și baze, care influențează stabilitatea enzimei, afinitatea sa pentru substrat, viteza reacției enzimatice.

Pentru multe enzime, curba pH-activitate are formă de clopot, dar ea poate varia considerabil la unele enzime mai ales în funcție de concentrația substratului, deoarece, în aceste cazuri, K_m se modifică odată cu pH-ul.

11.3.4. INFLUENȚA ACTIVATORILOR ȘI A INHIBITORILOR ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE

Activatorii se pot delimita greu de coenzime.

Aceștia sunt substanțe de natură anorganică sau organică, care accelerează reacțiile enzimatice.

Pot îndeplini rolul de activatori mai mulți anioni, cum sunt: Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} etc. și cationi ca: Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} etc., precum și o serie de compuși organici cu masă moleculară mică, cum sunt: esterii fosforici, glutat-ionul, cisteina etc.

Unii activatori au rolul de a proteja enzima împotriva unor factori de denaturare sau de inactivare, iar alții de a face substratul apt pentru atacul enzimei.

Ionii metalici determină o activare specifică a enzimelor și îndeplinesc, în cataliza enzimatică, atât un rol funcțional cât și un rol structural, întrucât ei constituie o parte esențială a centrului activ al enzimei.

Ionii metalici participă, întotdeauna, la înlesnirea formării complexului enzimă-substrat, precum și la formarea de complecși cu produsul rezultat din reacție, îndepărtându-l în acest fel din sistem.

Inhibitorii sunt substanțe cu moleculă mică, care se leagă de enzimă prin legături necovalente, și care, introduși în amestecul de reacție, provoacă scăderea vitezei reacției enzimatice sau o opresc.

Inhibitorii se pot clasifica, în funcție de mecanismul lor de acțiune, în *inhibitori reversibili* și *inhibitori ireversibili*.

O categorie aparte de inhibitori sunt inhibitorii ireversibili, care se leagă, de cele mai multe ori, printr-o legătură covalentă de un aminoacid din consti-

tuția enzimei, esențial pentru activitatea sa biologică, formând un compus stabil și inactiv.

Astfel, prin tratarea cu iodacetat la pH=5,5, ribonucleaza suferă o alchilare la două resturi de histidină din centrul său activ și își pierde activitatea catalitică.

Un alt exemplu, este acțiunea agentului de fosforilare *diizopropilfluorofosfatul* asupra unor enzime ca: *acetilcoliesteraza*, *chimo-tripsina*, *tripsina*, *fosfoglucomutaza* și unele *esteraze*, cu obținerea unor derivați inactivi, în care gruparea hidroxil a unui rest specific de serină este fosforilată.

Inhibitorii reversibili, după modul lor de acțiune, produc trei tipuri mai importante de inhibiție enzimatică: *competitivă*, *incompetitivă* și *necompetitivă*, după efectele inhibitorului asupra cineticii de reacție a enzimei și care pot fi analizate cu ajutorul ecuației fundamentale de viteză, Michaelis-Menten.

Enzima inhibată poate avea o valoare K_m crescută (*inhibiția competitivă*), o valoare V_{max} redusă (*inhibiția necompetitivă*), V_{max} și K_m reduse într-un raport constant (*inhibiția incompetitivă*) sau o combinație a acestor efecte (*inhibiția mixtă*).

J.Botts și M. Morales au prezentat o schemă generală cuprinzând unele tipuri de inhibiție.

În schema din fig.11.5. sunt ilustrate patru specii moleculare: enzima liberă, E, complexul enzimă-substrat, ES, complexul enzimă-inhibitor, EI, complexul enzimă-inhibitor-substrat, EIS și șase căi de reacție între ele [5].

La inhibiția competitivă, inhibitorul se poate combina cu enzima liberă, astfel că el concurează cu substratul pentru legarea de centrul activ.

Un inhibitor competitiv reacționează reversibil cu enzima pentru a forma un complex *enzimă-inhibitor* (EI) analog cu complexul enzimă-substrat:



Inhibiția competitivă este ușor de recunoscut pe cale experimentală, deoarece procentul de inhibiție la o concentrație fixă de inhibitor scade o dată cu creșterea concentrației substratului.

Un exemplu de inhibiție competitivă este a succinat dehidrogenazei de

către inhibitorul malonat întâlnit la ciclul acidului tricarboxilic, ca și anionii altor acizi dibazici.

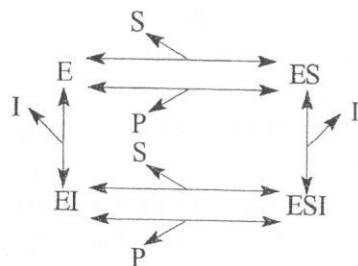


Fig.11.5. Schemă generală a diferitelor tipuri de inhibiție (J.Botts, M.Morales)

La inhibiția incompetitivă inhibitorul nu se combină cu enzima liberă și nu afectează reacția acesteia cu substratul.

În acest caz, inhibitorul se combină cu complexul enzimă-substrat și formează un complex inactiv enzimă-substrat-inhibitor, care nu mai poate conduce la o reacție ulterioară, de formare a produsului obișnuit :

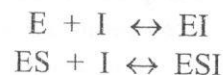


La inhibiția incompetitivă gradul de inhibiție crește când concentrația substratului crește.

La inhibiția necompetitivă, un inhibitor necompetitiv se poate combina cu enzima liberă sau cu complexul enzimă-substrat.

Inhibitorii necompetitivi se leagă de enzimă în alt loc decât în centrul activ, producându-se adesea modificări ale enzimei, ceea ce conduce la încetinirea formării complexului enzimă-substrat, iar complexul enzimă-substrat se descompune mai lent după formarea produșilor de reacție.

Reacția inhibitorului, la inhibiția necompetitivă duce la două forme inactive, EI și ESI :



Cei mai comuni inhibitori necompetitivi sunt reactivii care se pot combina reversibil cu grupe funcționale ale enzimei din afara centrului activ și care mențin conformația tridimensională a moleculei de enzimă catalitic activă. Unele enzime care conțin o grupare -SH în centrul activ sunt inhibate necompetitiv de către ionii metalelor grele.

Unele enzime care, pentru activitatea lor, necesită prezența ionilor metalici în centrul activ, pot fi inhibate necompetitiv de către agenții care sunt capabili să lege reversibil acești ioni. Astfel, este cazul *etilendiaminotetra-acetatul* (EDTA) care leagă reversibil ionii Mg^{2+} ca și alți cationi divalenți.

11.4. SPECIFICITATEA CATALIZEI ENZIMATICE

Fiecare enzimă catalizează un anumit tip de reacție posibilă din punct de vedere termodinamic, deci, are o anumită *specificitate de acțiune*.

Specificitatea de acțiune, o caracteristică esențială a enzimelor, este conferită de partea proteică a enzimelor (apoenzima), partea prostetică având un rol secundar.

Majoritatea enzimelor acționează asupra unui anumit substrat și mai rar asupra unui număr de substanțe înrudite structural cu acesta, deci, posedă o înaltă *specificitate de substrat*.

Specificitatea de substrat a enzimelor este un fenomen de mare însemnătate biologică, care stă la baza metabolismului.

Gradul specificității enzimelor este diferit de la o enzimă la alta, în funcție de natura acestora și de mecanismul reacției la care participă.

În funcție de specificitatea lor de substrat, enzimele pot fi grupate în patru categorii distincte: cu *specificitate absolută*, *specificitate absolută de grup*, *specificitate relativă de grup* și cu *specificitate stereochimică*.

Clasificarea aceasta este doar una convențională, deoarece nu se poate face o delimitare absolută. Unele enzime, catalizează reacția principală, dar manifestă și specificități de acțiune secundare catalizând reacții enzimatice diferite.

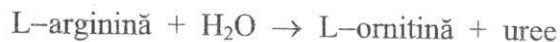
Specificitatea absolută. Unele enzime acționează asupra unui singur substrat, cu o anumită structură chimică, catalizează o singură reacție și sunt

inactive față de alte substanțe înrudite structural. Astfel, hidroliza ureei la CO_2 și NH_3 este catalizată de urează [5]:



Enzimele cu specificitate absolută se pot fixa, prin centrul lor activ, la substanțe înrudite cu substratul pentru care enzima are specificitate absolută acționând ca inhibitori enzimatici competitivi.

Specificitatea absolută de grup. Specificitatea absolută de grup se manifestă la enzima care acționează asupra unui număr mic de substanțe înrudite structural. Astfel, arginaza catalizează reacția care are loc în ciclul ureogenic:



Specificitatea relativă de grup. Enzimele cu specificitate relativă de grup acționează asupra anumitor legături chimice existente în substrat și nu țin cont de restul structurii chimice a substratului.

Lipaza hidrolizează numai substraturi emulsionate (un număr mare de esteri ai glicerinei și ai altor alcooli cu acizii grași, cu catenă lungă).

Fosfomonoesterazele hidrolizează o mare varietate de monoesteri ai acidului ortofosforic. Pirofosfat fosfohidrolaza catalizează, în mediu alcalin, scindarea hidrolitică a pirofosfatului anorganic, unii tri-, tetra- și polifosfați în prezența Mg^{2+} , a unor pirofosfați organici de tipul ATP, ITP, TPP, Nad în prezența Zn^{2+} sau Mn^{2+} .

Specificitatea stereochemică. Stereospecificitatea conferă enzimelor proprietatea de a recunoaște substraturi care conțin centri asimetrici și de a reacționa numai asupra unuia dintre izomerii optici. În cele mai multe cazuri specificitatea optică este absolută. Într-un mediu de reacție în care este prezent un amestec racemic, enzima reacționează numai asupra unui singur izomer.

Specificitatea absolută constă în aceea că enzima este adaptată unui substrat unic, tip cheie – broască. Acest tip de specificitate este mult răspândit și din acest motiv există în natură un număr mare de enzime.

Ipoteza mecanismului enzimatic de tip *cheie-broască* nu cuprinde în între-

gime particularitățile catalizei enzimaticе și nu explică pe deplin specificitatea sau procesele de inhibare ale unor enzime.

De aceea a fost emisă teoria inducerii locului specific de acțiune sub influența substratului, numită “*mână și mânășă*”.

Aceasta menține ideea centrului activ, cu mențiunea că substratul poate determina anumite schimbări de formă ale enzimei, rezultând o mai bună poziționare sau orientare pe suprafața a grupelor bio-catalitice.

Fenomenele au fost comparate cu tandemul mână (substrat) și mânășă (enzimă), când mânășă copie cu fidelitate forma mâinii. Mecanismul catalizei enzimaticе, conform acestei teorii, este ilustrat în Fig.11.6 [4].

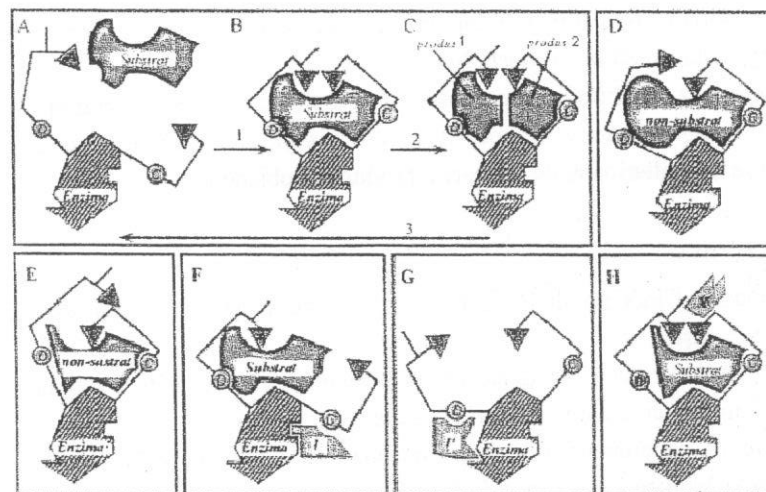


Fig.11.6. Mecanismul “*mână și mânășă*” al catalizei enzimaticе

Explicația figurii 11.6.: pasul 1 – compusul inițial al biocatalizei se apropie de suprafața enzimei și induce schimbări adaptative, stereochemice, ale acesteia, spre o perfectă orientare a grupelor catalitice - formele triunghiulare A și B (iar C și D reprezintă grupele de legătură ale substratului esențiale activității catalitice); pasul al 2-lea constă în reacția propriu-zisă cu formarea

produşilor 1 şi 2; pasul al 3-lea constă în separarea enzimei de produşii biocatalizei şi capacitatea acesteia de a cataliza o nouă reacţie.

Compuşi non-suhrat care sunt fie prea voluminoşi (D) fie prea mici (E) afectează forma enzimei rezultând a aliniere neconformă a grupelor reactive A şi B (asemenea compuşi nu pot su-feri cataliza specifică a enzimei date).

F - inhibarea necompetitivă, când inhibitorul (I) blochează reacţia dar nu împiedică legarea enzimei de non-suhrat; inhibitorul atrage grupa de legătură C în timp ce B este prea departe de de suhrat ca să aclaŇzeze reacţia;

G - inhibitorul I' afectează gruparea esenţială de legătură D;

H - molecula unui activator X determină centru activ aşa fel încât molecula non-suhrat se adaptează enzimei iniţiindu-se astfel bioreacţia. Molecula X este numită activator *allo-steric*.

11.5. ENZIME PROTEOLITICE

Dintre enzimele proteolitice se vor trata, mai ales, pe acelea care sunt prezente în organismul vertebratelor. Enzimele proteolitice au o importanţă fiziologică deosebită.

Principala reacţie catalizată de acestea este hidroliza legăturii peptidice, amidice şi esterice din moleculele proteice, dar şi cataliza unor reacţii de esterificare, transesterificare etc. Ele se găsesc în tractul gastrointestinal, dar şi în ficat, splină, rinichi, glandele endocrine, creier, unele ţesuturi şi fluide corporale. Unele se găsesc şi în plante şi în microorganisme.

11.5.1. ENZIME PROTEOLITICE ALE VERTEBRATELOR

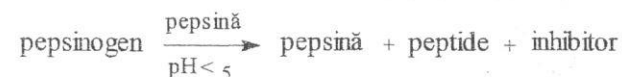
Organismul animal asimilează numai acizi aminici liberi, nu şi peptide sau proteine. Hidroliza completă a unei proteine până la aminoacizi are loc numai prin cooperarea mai multor enzime.

Se disting două grupe mari de enzime proteolitice: *proteinazele* care hidrolizează proteinele native până la peptide mari (pepsina, tripsina, chimotripsina) şi *peptidazele*, care hidrolizează peptidele până la aminoacizi (*car-*

boxipeptidaze, aminopeptidaze, dipeptidaze). Pe baza cercetării specificităţii enzimelor s-a constatat că pepsina şi tripsina nu hidrolizează numai proteinele native, ci şi peptide mici dacă acestea conţin anumiţi aminoacizi.

Max Bergmann a ajuns la concluzia că enzimele proteolitice sunt peptidaze. De aceea, enzimele proteolitice au fost împărţite în *endopeptidaze*, care corespund proteinazelor şi care rup legături peptidice, dând naştere la peptide şi *exopeptidaze*, care corespund peptidazelor şi care rup legăturile peptidice de la marginea catenei şi eliberează aminoacizi.

Pepsina a fost izolată din sucul gastric al vertebratelor, al păsărilor, al unor peşti şi al omului. Pepsina este secretată de către mucoasa stomacală într-o formă inactivă, *pepsinogenul*. Pepsinogenul este transformat în pepsină sub influenţa mediului puternic acid din stomac. Pepsina, o dată formată, transformă noi cantităţi de pepsinogen în pepsină. Are loc o autocataliză în care pepsinogenul, cu greutatea moleculară de 42500, suferă o rupere a moleculei cu formare de peptide, cu caracter bazic şi caracter acid, a căror masă moleculară este de aproximativ 4600, şi a unui inhibitor de natură proteică:



Pepsina este activă numai în soluţie puternic acidă (pH optim 1,5–2,0). Inhibitorul pepsinei, cu masa moleculară de aproximativ 3100, reacţionează cu pepsina la pH=5,6, cu formarea unui complex pepsină–inhibitor, care disociază la valori de pH<5.

În duoden şi în intestin, unde mediul este slab bazic (pH= 8), pepsina este complet inactivată şi digestia este continuată de enzimele din sucul pancreatic (*tripsina, chimotripsina* şi *carboxipeptidaza*) şi de amestecul de enzime secretat de mucoasa intestinului.

Pepsina este constituită dintr-o singură catenă polipeptidică, care conţine trei punţi disulfidice, şi este formată, predominant, din resturi de aminoacizi monoaminodicarboxilici, resturi de aminoacizi cu caracter hidrofob, resturi de prolină şi hidroxi-aminoacizi, mai ales serină.

Aceasta face ca molecula de pepsină să aibă o sarcină globală electrone-

gativă, iar $pH_i = 1$. Pepsina este o enzimă proteolitică care are activitate proteazică, dar și activități peptidazice, esterazice și transpeptidazice.

Activitatea pepsinei este dependentă de două grupări ionizate: una cu un pK_a de aproximativ 1, în forma ei deprotonată și alta cu un pK_a de aproximativ 4 sub formă protonată [5].

Mecanismul de acțiune al pepsinei presupune două posibilități de formare a unui complex covalent intermediar între enzimă și substrat: un intermediar amino în care are loc un transfer al unei grupări amino a substratului la o grupare carboxil a enzimei și un intermediar acil care necesită transferul unei grupări acil a substratului. Este posibil ca în procesul catalitic să se formeze ambii intermediari. Formarea și disocierea compușilor covalenți intermediari sunt procese reversibile.

Pepsina acționând asupra proteinelor, hidrolizează cu precădere legăturile peptidice formate cu participarea resturilor de aminoacizi cu catenă laterală hidrofoabă și a legăturilor peptidice dintre resturile de: Arg-Ile, Gln-Arg, Leu-Lys, Ile-Lys, Glu-Lys, Asn-Thr, Val-Ala, Trp-Trp, Ser-Asp, Gly-Arg, Gly-Glu etc. [5].

PH-ul optim de hidroliză al pepsinei asupra proteinelor este de 1,8 și variază între $2 < pH < 4$.

Gastricsina, identificată în sucul gastric de la om, câine, porc (în extractul acid al mucoasei gastrice) etc., este o enzimă proteolitică cu pH optim de acțiune 3–4, caracterizată prin stabilitate în mediul alcalin și termostabilitate, diferite de ale pepsinei. Este posibil ca gastricsina și pepsina să se formeze dintr-un precursor comun.

Rennina cu zimogenul său *prorennina*, denumiri adoptate de Comisia de Enzimologie (IUB), este cunoscută sub diferite denumiri: *chimază*, *chimozină*, *ferment de coagulare*, *labferment*. Rennina este enzima din sucul stomacal al animalelor ierbivore tinere, care are o deosebită putere de coagulare a laptelui. După proprietățile fizico-chimice, se apropie mult de pepsină.

Are masa moleculară de 33000–34000 și conține cantități mari de serină și prolină. Rennina se formează din prorennină la $pH < 5$, este stabilă la $pH = 3,5 - 6,3$, are maximum de activitate la $pH = 3,5-3,7$ și se inactivează la valori mai

mari de $pH=6,5$. Rennina hidrolizează unele substraturi specifice și pentru pepsină: hemoglobina, cazeina, catena polipeptidică B a insulinei.

Enzimele proteolitice tisulare sunt proteinazele intracelulare care hidrolizează proteinele în mediu slab acid (*catepsinele*) și *kalikreinele*, enzime proteolitice din glandele salivare și pancreas și acționează la valori de pH alcaline.

Catepsinele au fost izolate din țesuturi diferite și caracterizate fizico-chimic. Ele au fost denumite *catepsinele A, B, C, D, E*.

Catepsina A este prezentă în ficat, splină, rinichi, mușchii striati, se comportă ca o peptidază și este similară cu carboxipeptidaza A din pancreas.

Catepsina B se găsește în splină, rinichi, glandele suprarenale, glanda tiroidă, plămâni, mușchii striati. Hidrolizează proteine ca: β -lacto-globulina, edestina (o globulină vegetală din sămânța de cânepă), gelatina, albumina serică etc., la $pH=5-6$, care este pH-ul optim.

Catepsina C este prezentă în splină, ficat, rinichi, precum și în extractele diferitelor țesuturi animale. În stare pură, are o masă moleculară de 134000–210000, în funcție de specia de la care a fost recoltată. La $pH=5$ hidrolizează fragmente dipeptidice N-terminale din proteine ca: glucagonul, catena β – a insulinei oxidate, hormonul β -corticotrop etc., peptide, ester, amide și naftilamide ale dipeptidelor.

Catepsina C are acțiune transpeptidazică atunci când acceptorul grupărilor dipeptidil este o grupare amino și enzima catalizează o depolimerizare care duce la formarea de oligopeptide [5].

Catepsina D a fost identificată în splină, ficat, glandele suprarenale, glanda tiroidă, mușchii striati, creier etc. Catepsina D are o masă moleculară de 50000–60000, este termolabilă și hidrolizează la $pH=3$ hemoglobina denaturată în mediu acid și la $pH=4,2$ albumina serică denaturată. Nu hidrolizează substraturile specifice celorlalte catepsine.

Catepsina E a fost identificată în splină și măduva spinării. Este o enzimă termolabilă, are masa moleculară de 305000 și hidrolizează hemoglobina și albumina serică la $pH=2,5-3,5$. La $pH > 4,5$ devine inactivă.

Amino-peptidazele sau α -aminoacil-peptidhidrolazele sau *peptidhidrolazele* scindează resturile de aminoacizi de la extremitatea N-terminală a protei-

nelor sau peptidelor. Dintre aminopeptidaze se menționează: *leucilamino-peptidaza*, *aminopeptidaza M* și *aminopeptidazele A* și *B*.

Leucinaminopeptidaza a fost identificată în splină, rinichi, plămâni, mucoasa intestinală, tiroidă, hipofiză, elementele figurate ale sângelui, ovare, mușchii striati etc. Are masa moleculară de 300000, este o metaloenzimă care conține Zn^{2+} care este activată de ionii de Mg^{2+} și Mn^{2+} , are pH-ul optim de acțiune de 8–9, prezintă stereospecificitate deoarece acționează numai asupra legăturilor peptidice formate de L-aminoacizi și posedă o largă specificitate de substrat. Leucinaminopeptidaza este utilizată la determinarea secvenței aminoacizilor de la extremitatea N-terminală a catenelor polipeptidice.

Aminopeptidaza M a fost identificată în rinichi, are o masă moleculară de 280 000 și hidrolizează preferențial legăturile peptidice formate prin participarea alaninei, glicinei și leucinei.

Aminopeptidaza A a fost identificată în ficat, rinichi și duoden și este activată de ionii de Ca^{2+} . Are acțiune hidrolitică asupra resturilor de monoaminodicarboxilici de la extremitatea N-terminală a proteinelor și peptidelor.

Aminopeptidaza B a fost izolată din ficat, hidrolizează aminoacizii bibazici, arginina și lizina, de la extremitatea N-terminală a lanțurilor peptidice, cu condiția ca grupele aminice din pozițiile δ și ϵ să nu fie blocate.

Enzimele proteolitice ale pancreasului. La vertebrate, sucul pancreatic conține o serie de enzime active (*ribonucleaza*, *amilaza*, *lipaza*) și enzime sub formă de precursori inactivi (*zimogene*) ca: *tripsinogen*, *chimotripsinogen A* și *B*, *procarboxipeptidaza A* și *B*. Enzimele proteolitice pancreatice sunt sintetizate în ribozomii reticulului endoplasmatic al celulelor acinare din pancreas.

Tripsina se formează din tripsinogen, prin autocataliză, în prezența unor mici cantități de tripsină sau a unor alte enzime proteolitice (*enterokinaza*, *kinaza*, *aspergillopeptidaza A*, *peptidaza A* etc.).

Tripsina are acțiune catalitică puternică la transformarea zimogenelor altor enzime în formele lor active (chimotripsinogenele A, B, C, procarboxipeptidazele A, B și a zimogenului fosfolipazei A). Tripsina catalizează legăturile peptidice a căror funcție carboxil provine de la lizină și arginină, indiferent de lungimea secvenței de aminoacizi, precum și legăturile amidice și esterice ale

acestor doi aminoacizi bazici. Tripsina are intervalul optim de acțiune la pH=7–8. Ea face parte dintre peptidazele digestive (tabelul 11.2.) [6].

În tubul digestiv, proteinele sunt hidrolizate de peptidaze până la aminoacizi, care sunt absorbiți prin mucoasa intestinală. Enzimele care participă la acest proces sunt elaborate de stomac, intestin și pancreas.

Peptidazele, după specificitatea lor se pot grupa în *endopeptidaze*, care scindează legături peptidice din mijlocul unui lanț polipeptidic și *exopeptidaze*, care scindează legături peptidice de la capetele lanțurilor.

Exopeptidazele sunt *aminopeptidaze* și *carboxipeptidaze* după cum detașează aminoacizii de la capătul N-terminal sau C-terminal al lanțului.

Peptidazele digestive, în afara celor intestinale, sunt elaborate inițial sub formă de zimogeni, pentru a proteja celulele și canalele secretore de acțiunea lor proteolitică.

Zimogenii devin enzime active în lumenul tubului digestiv. Activarea are loc prin hidroliza unor legături peptidice care detașează anumite peptide sau aminoacizi sau modifică pliarea lanțului polipeptidic și eliberează centrul activ al enzimei care devine accesibil substratului.

Activarea zimogenului are loc în prezența ionilor de hidrogen, sub acțiunea unor peptidaze active sau autocatalitice, enzima activându-și propriul ei precursor.

Tripsina este o endopeptidază pancreatică, elaborată ca tripsinogen și este activată autocatalitic sau sub acțiunea unei peptidaze intestinale specifice, *enterokinaza*.

Conversia tripsinogenului în tripsină se produce prin detașarea unui hexapeptid de la capătul N-terminal al tripsinogenului.

Chimotripsina este o endopeptidază pancreatică.

Ea este elaborată ca *tripsinogen* care se activează în lumenul intestinal sub acțiunea tripsinei ce detașează patru aminoacizi sub forma a două dipeptide. Acțiunea hidrolitică a chimotripsinei are loc mai ales asupra legăturilor peptidice a căror grupare carboxil provine de la fenilalanină, tirozină sau triptofan.

Tabelul 11. 2.

Peptidazele digestive

Peptidaza	Țesutul care elaborează	Zimogenul	Activarea zimogenului	Specificitatea de acțiune
Pepsină	Stomac	Pepsinogen	H ⁺ și pepsină	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-CO- \\ R_2 = \text{tirozină, fenilalanină} \end{array}$
Gastricsină	Stomac	Pepsinogen	H ⁺ și pepsină	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-CO- \\ R_2 = \text{tirozină, fenilalanină} \end{array}$
Tripsină	Pancreas	Tripsinogen	Enterokinază și tripsină	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-CO- \\ R_1 = \text{lizină, arginină} \end{array}$
Chimotripsină	Pancreas	Chimotripsinogen	Tripsină	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-CO- \\ R_1 = \text{tirozină, fenilalanină, triptofan} \end{array}$
Elastază	Pancreas	Proelastază	Tripsină	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-CO- \\ R_1 \text{ și } R_2 = \text{aminoacizi hidrofobi} \end{array}$
Carboxipeptidază	Pancreas	Procarboxipeptidază	Tripsină	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-COOH \end{array}$

Amino-peptidază	Intestin	—	—	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-CO- \end{array}$
Dipeptidază	Intestin	—	—	$\begin{array}{ccc} R_1 & & R_2 \\ & & \\ -NH-CH-CO- & \downarrow & -NH-CH-COOH \end{array}$

Elastaza, endopeptidază pancreatică, este secretată de pancreas sub formă de *proelastază* și activată în lumenul intestinal de tripsină. Hidrolizează cu ușurință elastina, dar are specificitate pentru legăturile peptidice ale aminoacizilor cu radicali hidrofobi și, de aceea, participă la digestia altor proteine.

Carboxipeptidaza este o exopeptidază pancreatică secretată sub formă de *procarboxipeptidază* și este activată de tripsină. Hidrolizează legăturile peptidice de la capătul C-terminal al lanțurilor peptidice.

Amino-peptidaza este o exopeptidază elaborată de mucoasa intestinală și acționează asupra legăturilor peptidice de la capătul N-terminal al lanțurilor peptidice.

Dipeptidazele sunt un grup de enzime secretate de mucoasa intestinală și hidrolizează dipeptidele rezultate la hidroliza produsă de peptidazele digestive, endo- sau exopeptidaze.

11.5.2. ENZIME PROTEOLITICE ALE SÂNGELUI

Enzimele proteolitice ale sângelui sunt: *trombina*, *plasmina*, *kalikreina*, *carboxipeptidaza N*.

Trombina este o endopeptidază care participă la procesul de coagulare a sângelui. Se găsește în plasma sanguină într-o formă inactivă, zimogenul *protrombina* și numai în cantitate mică se află ca enzimă activă. Protrombina este sintetizată de ficat și este transformată în trombină activă de către enzima *autoprotrobina C* (*trombokinaza*). Transformarea protrombinei în trombină se realizează și în prezența unor enzime proteolitice ca, tripsina, catepsina C, a enzimelor proteolitice din veninul de șarpe. Trombina hidrolizează esteri și

amide ale argininei și lizinei la pH=8. Substratul natural al trombinei este *fibrinogenul* (proteină fibrilară solubilă din plasma sanguină) pe care-l hidrolizează cu formare de fibrinopeptide A și B.

Plasmina sau *fibrinolizina*, enzimă cu specificitate de substrat redusă, se găsește în plasma sanguină, în cea mai mare parte sub formă de *plasminogen* sau *profibrinolizină*, precursor inactiv catalitic secretat de eozinofilele măduvei osoase și face parte din fracțiunea β -globulinelor plasmatică. Trecerea plasminogenului în plasmină este un proces autocatalitic, dar poate fi catalizat și de alte enzime ca: tripsina, streptokinaza și urokinaza.

Plasmina și plasminogenul sunt termorezistente și stabile la pH=2-3. Plasmina umană și de bovine încălzită la temperatura de 100°C, timp de 30 min, la pH=1,8, păstrează 40% din activitate.

Fibrina și *fibrinogenul* sunt substraturile naturale ale plasminei pe care le hidrolizează, iar compușii rezultați au activitate anticoagulantă. La pH-ul fiziologic hidrolizează, de asemenea, β -lactoglobulina, hemoglobina denaturată, cazeina, gelatina, esterii ai lizinei și argininei.

Kalikeina plasmatică este biosintetizată de ficat și are acțiune asupra *kininogenului plasmatic* punând în libertate *bradikina*, o nonapeptidă care determină contracția mușchilor netezi și este un vasodilatator. *Kalikeina* plasmatică diferă de kalikeinele pancreasului și ale glandelor salivare prin capacitatea ei catalitică și proprietățile fizico-chimice. *Kalikeina* este elaborată de ficat sub formă de *prekalikeină* sau *kalikeinogen*, care în prezența tripsinei sau a factorului Hageman (o enzimă de tip protează) este transformat în enzimă activă.

Carboxipeptidaza N se găsește în serul sanguin al mamiferelor, peștilor, amfibienilor, păsărilor, în limfa, urina și trombocitele de om și acționează asupra bradikininei, kalidinei și se deosebește prin specificitatea de substrat și raporturile ei cu activatorii și inhibitorii de carboxipeptidazele A și B izolate din ficat [5].

Carboxipeptidaza N este activată de Co și Ni și inactivată de Cd și de acidul ϵ -aminocapronic.

11.5.3. ENZIME PROTEOLITICE DE ORIGINE VEGETALĂ

Dintre enzimele de origine vegetală de însemnătate mai mare sunt: *papaina*, *chimopapaina*, *ficina*, *bromelaina*.

Papaina a fost extrasă din arborele *Carica papaja*, din toate părțile plantei afară de rădăcină, dar în special din fructele arborelui. Latexul de *Carica papaya* conține *papaia*, *chimopapaina* și *peptidaza A*.

Papaina cristalizată are $pH_i=9$, o masă moleculară de 20700 și o activitate catalitică scăzută. Creșterea activității catalitice se produce în prezența unor reducători ca: cisteina, glutationul redus, acidul tioglicolic, borohidrua de sodiu, a unor compuși capabili să lege ionii metalelor.

Papaina este inhibată reversibil de apa oxigenată și ireversibil de iod, iodacetat, iodacetamidă, bromacetat, p-clormer-curbenzoatul de sodiu.

Molecula de papaină constă dintr-un lanț polipeptidic format din 212 resturi de aminoacizi, cu trei punți disulfidice, o grupă sulfhidril liberă și conține patru regiuni cu structură de α -helix.

Papaina, enzimă proteolitică, are o largă specificitate de substrat. Ea catalizează hidroliza proteinelor native și denaturate, a peptidelor rezultate în urma acțiunii tripsinei și chimotripsinei, hidrolizează toate legăturile peptidice indiferent de natura aminoacizilor.

Chimopapaina a fost separată din latexul arborelui *Carica papaja*, are o acțiune hidrolitică mai mare decât a papainei, o masă moleculară de 27000 - 35000 și este mai rezistentă la valori de pH acide, în comparație cu papaina.

Ficina extrasă din latexul de *Ficus glabrata*, *Ficus carica* varietatea *Calimyrna*, *Ficus carica* varietatea *Kadota*, are masa moleculară de 25000-26000, este formată dintr-o singură catenă polipeptidică, este o tiol-enzimă care se inactivează de către agenții oxidanți sau cei care blochează grupările SH.

Ficina are o largă specificitate de substrat, hidrolizând numeroase proteine prin scindarea legăturilor peptidice dintre resturile de tirozină și fenilalanină, la pH=6,5-9,5.

Bromelaina reprezintă un grup de enzime care s-au extras din fructele și din alte părți ale plantei *Bromeliaceae*. Este formată dintr-un singur lanț polipeptidic ce conține 285 aminoacizi și o singură grupare tiol, are o masă moleculară de 33000–35500.

11.5.4. ENZIME PROTEOLITICE MICROBIENE ȘI FUNGICE

Microorganismele produc și eliberează în mediul de cultură numeroase exoenzime proteolitice, în majoritate zimogene, care în general, se caracterizează prin conținutul redus de tioaminoacizi, un număr mic sau absența totală a punților disulfidice și caracterul apolar al majorității aminoacizilor componenți. După structura centrului activ al enzimelor proteolitice microbiene și fungice se pot grupa în: *serin-enzime*, *tiol-enzime*, *metal-enzime*, *proteinaze acide* și *proteinaze bazice* [5].

Pe lângă exoenzime, microorganismele elaborează numeroase peptidaze și proteinaze intracelulare. Diferite tulpini de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus* și *fradiae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, diferite tulpini de *Clostridium* (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium perfringens*) etc., dau în mediul de cultură proteaze alcaline cu activitate optimă la pH=8–10 și proteaze neutre.

Dintre *proteazele alcaline* se menționează *Subtilizinele*, *Subtilizina A* și *Subtilizina B* elaborate de diferite tulpini de *Bacillus subtilis* și *Subtilizina C* elaborată de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Proteaza alcalină* izolată din *Bacillus subtilis varietatea amylosaccariticus*, *Proteaza alcalină* și *Elastaza* produse de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteaza G* elaborată de *Streptomyces griseus*, *Keratinaza* elaborată de *Streptomyces fradiae*, *Proteaza neutră* din *Bacillus subtilis*, *Aspergillopeptidaza B* din culturile de *Aspergillus oryzae* și *Colagenaza* (*Clostridiopeptidaza A*) din diferite tulpini de *Clostridium*.

Subtilizinele hidrolizează cu rapiditate proteinele denaturate, esterii și amidele aminoacizilor, esterii acizilor grași inferiori. La pH=5 se denaturează ireversibil.

Proteaza alcalină provenită de la *Pseudomonas aeruginosa* are o masă moleculară de 48500, un pH optim de acțiune de 7 până la 9 și este stabilă în

intervalul de pH de 5,0 și 9,0. Hidrolizează hemoglobina, ovalbumina, cazeina, gelatina și nu are acțiune asupra collagenului.

Elastaza din *Pseudomonas aeruginosa* are o masă moleculară de 39500, are un optim de acțiune la pH=8, scindează elastina și alte proteine (dar nu și collagenul nativ și keratina), hidrolizând legăturile peptidice formate prin participarea grupelor aminice de la alanină, leucină, valină, fenilalanină, tirozină. *Elastaza*, față de alte proteaze alcaline, conține tioaminoacizii metionina și cistina, precum și legătura Cys – S – S – Cys.

Proteaza G obținută din *Streptomyces griseus* și *Streptomyces fradiae* alături de alte peptidaze, hidrolizează la pH=7–8 ovalbumina, cazeina, glutelina.

Keratinaza, separată din culturile de *Streptomyces fradiae*, are o masă moleculară de 27000, hidrolizează keratina nativă cu formare de peptide, la pH = 9, ca și pe alte proteine ca hemoglobina, cazeina. Din culturile de *Aspergillus oryzae* s-a preparat proteaza alcalină *Aspergillo-peptidaza B* cu o masă moleculară de 18000. Această protează este termolabilă, sensibilă la agenții denaturanți ca ureea, guanidina hidroclorică și acționează hidrolizant asupra cazeinei la pH=10,3–10,5.

Proteazele neutre au fost izolate din filtratele unor culturi ca: *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis varietatea amylosacchariticus* și *Bacillus amyloliquefaciens*. Produc hidroliza unui număr mare de proteine (gelatină, cazeină, ovalbumină, hemoglobină etc.) și acționează optim la pH=6–8. *Proteazele neutre* de la *Bacillus subtilis* hidrolizează legăturile peptidice formate de aminoacizii: leucina, izoleucina, valina, fenilalanina.

Colagenaza (*Clostridiopeptidaza A*) este un reprezentant al proteazelor neutre și rezultă din unele tulpini ale genului *Clostridium* (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium perfringens*). Are o mare specificitate de substrat. Hidrolizează collagenul nativ și denaturat la temperatură și pH fiziologice. Nu hidrolizează proteinele globulare: globulina, albumina, cazeina și nici proteine fibrilare ca: elastina, keratina, fibroina.

Colagenaza scindează legăturile peptidice din imediata vecinătate a resturilor de prolină și hidroxiprolină și la care participă un rest de glicină.

Proteazele acide izolate din fungii au proprietatea de a transforma tripsinogenul în tripsină. O astfel de peptidază este *Aspergillopeptidaza A* obținută din ciuperca microscopică *Aspergillus saitoi*, care hidrolizează diferite proteine naturale la pH=2,5–3,0, și are o specificitate de substrat mai largă decât pepsina. *Aspergillopeptidaza A* este stabilă la valori de pH cuprinse între 2,5 și 6,0. Aceasta se datorește cantității mari de resturi de aminoacizi monoamino-monocarboxilici și monoaminodicarboxilici, care se găsesc în structura enzimă și îi conferă caracter acid.

Din *Penicillium janthinellum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus oryzae* varietatea *macrosporus*, *Paecilomyces varioti* etc., s-au separat proteaze acide denumite „peptidaze A” și „peptidaze B” care transformă tripsinogenul în tripsină și au proprietăți fizico-chimice asemănătoare cu ale proteazei acide *Aspergillopeptidaza A*.

Bibliografie selectivă

1. Lehninger A.L. *Biochimie*, vol. I și II, Editura Tehnică, București, 1992
2. Nenițescu C.D., *Chimie Organică*, vol. I și II, Editura Didactică și Ped., București, 1980
3. Chiriță G., Chiriță M., *Pielea Animală*, Editura Tehnică, București, 1993.
4. Chiriță M., *Biopolimeri și Compozite Naturale*, Colecția BIOINGINERIE MEDICALĂ. Nr.1., Editura Tehnică-Info, Chișinău, 2001
5. Dumitru I.F., Iordăchescu D., *Introducere în Enzimologie*, Editura Medicală, București, 1981
6. Cornish-Bowden A., *Analysis of Enzyme Kinetic Data*, Oxford University Press, Oxford, 1995
7. Popescu A., Cristea E., Zamfirescu – Gheorghiu M., *Biochimie Medicală*, Editura Medicală, București, 1980
8. Fersht A., *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W.H. Freeman, New York, 1999
9. Dumitru I.F., Iordăchescu D., *Enzime*, Editura Medicală, București, 1974
10. Chiriță M., Chiriță Gh., *Tratat de biomolecule*, Ed.I, Vol.I, Ed.Sedcom Libris, Iași, 2009

11. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Eds. Alan J. Barrett, Neil D. Rawlings J. F., 3rd Edition, Academic Press, 2013
12. Schomburg I., Chang A., Placzek S., et al., *Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA*, Nucleic Acids Res., 41, 2013
13. Suzuki H., Chapter 4: Effect of pH, Temperature, and High Pressure on Enzymatic Activity. *How Enzymes Work: From Structure to Function*, Boca Raton, FL: CRC Press, 2015
14. *Advances in Enzyme Biotechnology*, Editors: Shukla P., Pletschke B.I. (Eds.), Springer, 2013
15. *Classification and Nomenclature of Enzymes by the Reactions they Catalyse*, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html>, (NC-IUBMB), 2016
16. Mookhtiar K.A. Van Wart H.E., *Clostridium histolyticum collagenases: a new look at some old enzymes*, Matrix Supplement, 1, 1992
17. Purich D.L., Allison R.D., *The enzyme*, San Diego, Academic Press, 2002
18. Chang-Hwei C., *Activation and Detoxification Enzymes*, Springer, 2012
19. Petsko G. A., Ringe D., *Structure et fonction des protéines*, De Boeck, 2009
20. Karich A., Scheibner K., Ullrich R., Hofrichter M., *Exploring the catalase activity of unspecific peroxygenases and the mechanism of peroxide-dependent heme destruction*, J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016